REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER VIRUSSPEZIFISCHEN RESERVE TRANSKRIPTASE AUS MENSCHLICHEM OVARIALKARZINOM

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

von

Marilena Rezzonico Woltersdorf
aus Como, Italien

aus Frankfurt am Main

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Gustav-Embden-Zentrum der Biologischen Chemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main
Abteilung für Molekularbiologie
(Leiter: Professor Dr. P. Chandra)

REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER VIRUSSPEZIFISCHEN REVERSE TRANSKRIPTASE AUS MENSCHLICHEM OVARIALKARZINOM

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

von

Marilena Rezzonico Woltersdorf
aus Como, Italien

Frankfurt am Main 1982

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Biologie,
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

Dekann : Prof. Dr. Gieß
Erster Berichterstatter : Prof. Dr. Fasold
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Chandra

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juni 1983

Per te, Mamma.

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. P. Chandra danke ich für die Überlassung des Themas und für die weitgehende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Fasold danke ich für die freundliche Betreuung dieser Dissertation.

Herrn Dr. M. Woltersdorf danke ich für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Dr. R. Kreienberg danke ich ebenfalls für die freundliche Überlassung des Tumorgewebes.

Frau Angelika Vogel danke ich für die Mitarbeit bei der Standardisierung einiger Methoden. Für die technische Mithilfe danke ich Herrn B. Ivanković.

A B K Ü R Z U N G S V E R Z E I C H N I S

Viren:	AMV	Avian Myeloblastosis Virus
	ASV	Avian Sarcoma Virus
	BaEV (BV-M7)	Baboon Endogene Virus
	CMV	Cytomegalie Virus
	EBV	Epstein-Barr Virus
	FeLV	Feline Leukemia Virus
	FLV	Friend Leukämie Virus
	FSV	Feline Sarcoma Virus
	GaLV	Gibbon Leukemia Virus
	HaLV	Hamster Leukämie Virus
	HL-23V	Human Leukemia Virus
	HSV-2	Herpes Simplex Virus-2
	HTLV	Human cutaneous T-Lymphoma Virus
	Mo-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
	Mo-MuSV	Moloney Murine Sarcoma Virus
	MPV	Mason-Pfizer Virus
	MuMTV	Murine Mammary Tumor Virus
	RAV_0	Rous associated Virus-0
	RD 114 V	Rhabdomyosarcoma Virus
	REV	Reticuloendotheliosis Virus
	RLV	Rauscher Leukämie Virus
	RSV	Rous Sarkom Virus
	SiSV	Simian Sarcoma Virus
Krankheiten:	ALL	Akute lymphatische Leukämie
	AML	Akute myeloische Leukämie
	CLL	Chronische lymphatische Leukämie
	CML	Chronische myeloische Leukämie
	IM	Infektiöse Mononukleose
	NPC	Nasopharyngeal Carcinoma
Verschiedenes:	EBNA	Epstein-Barr Nuklear Antigene
	RNase H	Ribonuklease (Hybrid-Doppelstränge angreifend)
	RT	Reverse Transkriptase
	VCA	Virus Capside Antigen
	70 S RNA	Retrovirusgenom

p30	Protein aus dem Core der Retroviren
gp52-71	Glykoprotein aus der Virushülle
PAA	Phosphonoacetat

Andere Abkürzungen in Material und Methoden.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite:
1.	EINLEITUNG	
1.1.	Einführung	1
1.2.	Onkogenese durch DNA-Tumorviren beim Menschen	1
1.2.1.	Herpesviren: Epstein-Barr Virus	4
1.2.2.	Herpesviren: Herpes Simplex Typ-2	10
1.3.	Onkogenese durch Retroviren bei Tieren	13
1.3.1.	Morphologie der Retroviren	13
1.3.2.	B-Typ Partikel und Mammatumore bei Tieren	14
1.3.3.	C-Typ Partikel und verschiedene Tumoren bei Tieren	15
1.3.4.	Replikation der Retroviren	16
1.3.4.1.	Entwicklung der Modellvorstellungen	16
1.3.4.2.	Mechanismus der reversen Transkription (Provirus Bildung)	18
1.3.4.3.	Die Genprodukte der Retroviren	24
1.3.5.	Mögliche Herkunft und Bedeutung der Retroviren	26
1.4.	Retroviren und menschliche Onkogenese	29
1.4.1.	Hinweise auf B-Typ Viren	31
1.4.2.	Hinweise auf C-Typ Viren	34
1.5.	Eigenschaften der retroviralen Reverse Transkriptasen	37
1.5.1.	Biochemische Eigenschaften der viralen Enzyme	37
1.5.1.1.	Die DNA-Polymeraseaktivität	37
1.5.1.2.	Die RNase-Aktivität	41
1.5.2.	Strukturelle Merkmale der viralen Enzyme	43
1.5.3.	Nachweis retroviraler Reverse Transkriptasen aus menschlichen Tumoren	46
2.	AUFGABENSTELLUNG	49
3.	MATERIAL UND METHODEN	51
3.1.	Geräteverzeichnis	51
3.2.	Materialverzeichnis	52
3.3.	Chemikalienverzeichnis	53
3.4.	Nachweismethoden und Konzentrationsbestimmungen	54
3.4.1.	Quantitative Bestimmung von Ribonukleinsäure	54

Seite:

3.4.2. Quantitative Bestimmung von Desoxyribonukleinsäure 57
3.4.3. Quantitative Bestimmung von Proteinen 57
3.4.4. Bestimmung der KCl-Konzentration bei Gradienten 60
3.4.5. Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität bei der DNA-Synthese 60
3.5. Reinigung viraler 70 S RNA 62
3.6. Vorbereitung der Chromatographiesäulen 65
3.6.1. Anionenaustauscher 65
3.6.2. Kationenaustauscher 67
3.6.3. Affinitätschromatographie 68
3.6.4. Gelfiltration 70
3.7. Methoden zur Reinigung von Reverse Transkriptasen 71
3.7.1. Homogenisation, Zentrifugation und Gelfiltration 72
3.7.2. Chromatographie mit DEAE-Cellulose DE 23 oder DEAE-Sephadex A_{50} 74
3.7.3. Chromatographie mit DEAE-Cellulose DE 52 74
3.7.4. Chromatographie mit Phosphocellulose P_{11} oder CM-Sephadex 75
3.7.5. Affinitätschromatographie (Poly(C)-Sepharose) 76
3.7.6. Isoelektrische Fokusierung im Dichtegradienten 76
3.7.7. Diskussion der Reinigungsmethoden 80
3.8. Durchführung der DNA-Biosynthese mit DNA-Polymerasen 83
3.8.1. Vorbereitung der Lösungen 83
3.8.2. Bestimmung des Desoxyribonukleotideinbaues in die DNA bzw. in synthetische Matrizen-Primer 87
3.8.3. System zur Untersuchung der DNA-Polymeraseaktivität 89
3.9. Methoden zur biochemischen Charakterisierung der gereinigten DNA-Polymerasen 94
3.9.1. Abhängigkeit der Enzymaktivität von Ionen 94
3.9.2. PH-Abhängigkeit der Enzymaktivität 94
3.9.3. Abhängigkeit der gereingigten DNA-Polymerase-Aktivität von Matrizen-Primern 96
3.9.4. Transkription gereinigter 70 S RNA 97
3.9.5. Untersuchung auf Terminaldesoxyribonukleotidyl-

Seite:

transferase 97
3.9.6. Temperaturstabilität der DNA-Polymeraseaktivitäten 97
3.10. Hemmung der gereinigten Reverse Transkriptase durch neutralisierende Antikörper 98
3.11. Elektrophorese 98
3.11.1. SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese 99
4. ERGEBNISSE 104
4.1. Reinigung und Charakterisierung der Reverse Transkriptase aus einem Karzinom des Ovars 104
4.1.1. Extraktion 104
4.1.2. Säulenchromatographie 108
4.1.3. Isoelektrofokusierung 113
4.1.4. Molekulargewicht der Reverse Transkriptase 120
4.2. Biochemische Charakterisierung der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom 125
4.3. Immunologische Charakterisierung der Reverse Transkriptase 136
4.4. Reinigung und Charakterisierung der Reverse Transkriptase aus einem Mammakarzinom 140
5. DISKUSSION 164
6. ZUSAMMENFASSUNG 179
7. LITERATURVERZEICHNIS 182

1. EINLEITUNG

1.1. EINFÜHRUNG

Die Reverse Transkriptase (RT) wurde 1970 (BALTIMORE, TEMIN und MIZUTANI) als Bestandteil von tierischen Retroviren entdeckt. Sie ist von zentraler Bedeutung für die Replikation des Virusgenoms in den infizierten Zellen.
Der erste Hinweis dafür, daß ein Virus als Ursache von Krebs in Frage kommt, wurde schon von ELLERMAN und BANG (1908) erbracht. Sie bemerkten, daß die Leukose, eine bei Hühnervögeln verbreitete Leukämieform, durch einen Erreger übertragen wird, der auch feinste Filter durchdringt. Diese Beobachtung wurde drei Jahre später durch ROUS (1911) bestätigt. Er zerkleinerte etwas Tumorgewebe aus Hühnern, ließ es durch einen Filter laufen und injizierte das Filtrat anderen infizierbaren Tieren. Dieser zellfreie Extrakt erzeugte ein Fibrosarkom (Rous-Sarkom) und verlangsamtes Wachstum, d.h. genau die gleichen Symptome, welche nach der Transplantation von lebendem Tumorgewebe bei den Hühnern festgestellt werden konnten.
Seitdem ist noch eine ganze Reihe von Viren bekannt geworden, die bei den verschiedenen Säugetieren Krebs erzeugt.Dies führte zu umfangreichen Anstrengungen, entsprechende Erreger auch beim Menschen nachzuweisen, da man davon ausging, daß der Mensch prinzipiell von den gleichen natürlichen Einflüssen betroffen werden kann wie die Tiere. Bei der Suche nach den krebsinduzierenden oder krebsfördernden Agenzien bemühte man sich also Viruspartikel oder auch die anderen Anhaltspunkte zu finden, die schon von den Tiermodellen her bekannt waren.

1.2. ONKOGENESE DURCH DNA-TUMORVIREN BEIM MENSCHEN

Die Erforschung der Virusvermehrung in Tieren wurde ganz entscheidend durch die vorhergehenden Arbeiten über Bakteriopha-

UNIV. LIBRARY

gen beeinflußt. Da Bakterien relativ einfache und gut kultivierbare Einzeller sind, boten sie für virologische Studien viele Vorteile. So wurden grundlegende Teckniken und Erkenntnisse entwickelt und vervollständigt, welche auch für die Untersuchung der Infektiosität und den Vermehrungsmechanismus tierischer Viren von Bedeutung sind.

Der Reproduktionszyklus der Viren (FENNER et al. 1974) läßt sich in charakteristische Phasen einteilen, die aber unterschiedlich verlaufen können, jenachdem welcher Gruppe der Virus angehört. Die erste Phase der Infektion besteht in der Bindung der Viruspartikel an eine aufnahmefähige Zelle. Die Anlagerung ist anfänglich elektrostatischer Natur und wird deshalb merklich durch die Anwesenheit von Ionen beeinflußt. Wenn an den Zellen Oberflächenstrukturen (Rezeptoren) vorhanden sind, an denen sich ein Virus spezifisch befestigen kann, stabilisiert sich die anfängliche schwache Wechselwirkung durch Ionenbindungs- und Van-der-Waals-Kräfte.
Im Falle der "großen" Bakteriophagen und der Pflanzenviren wird während der nun folgenden Penetrationsphase die Bakterienhülle bzw. Pflanzenzellwand enzymatisch aufgelöst und die Nukleinsäure des Virus mit Hilfe eines Injektionsmechanismus ins Zellinnere hineingedrückt, während die Proteinhülle des Phagen außen an der Zelle zurückbleibt. Bei den tierischen Viren senken sich die Partikel nach der Adsorption in die Zellmembran ein, wodurch sie dann in ein Phagocytosebläschen eingeschlossen werden. Indem sich die Proteinhüllen auflösen, entlassen die Viren ihr genetisches Material in das Cytoplasma. Einige andere bei Tieren vorkommende Virusarten scheinen dagegen erst ihre Hülle mit der Plasmamembran der Zelle zu verschmelzen, bevor das Nucleocapsid freigesetzt wird. Die Phase, die auf das Eindringen der Viren und ihrer Befreiung vom Proteinmantel folgt, nennt man die Eclipse, während der die Wirtszelle keine infektiösen Partikel enthält, obgleich das Vorhandensein fremder Nukleinsäure nachweisbar ist. Während dieser Zeit werden die viralen DNA-Sequenzen in RNA transkribiert, mit deren Hilfe später an den Ribosomen des Cytoplasmas die virusspezifischen Proteine

hergestellt werden können. Die RNA wird aber zunächst in Form von größeren Abschnitten transkribiert, die polycistronische Sequenzen darstellen und erst danach in kürzere monocistronische Messenger-RNA zerteilt werden. Dabei wird auch nicht sofort die gesamte genetische Information transkribiert, sondern es existieren zwei aufeinanderfolgende Phasen, die "frühe" und "späte" m-RNA hervorbringen. Die "frühen" Gene liegen schon als monocistronische m-RNA vor und können in Proteine übersetzt werden, bevor die Replikation der DNA stattfindet. Sie stellen nur die Minderheit der viralen Genprodukte dar und codieren nicht für Strukturproteine sondern z.B. für Enzyme, die an der Replikation und der Transkription der DNA beteiligt sind. Andere, wie die T-Antigene findet man später an der Plasmamembran der infizierten Zellen. Die virale Erbinformation kann aber auch in die DNA der Wirtszelle integriert werden und gerade dies scheint im Zusammenhang mit der Transformation und der Tumorentwicklung zu stehen.

Die nächste Phase der Infektion besteht in der Replikation der viralen DNA. Während dieses Vorgangs sammeln sich argininreiche Proteine an, die sich an die virale DNA anlagern. Sie ähneln den Histonen und kommen im Core vieler DNA-Viren vor. Bei der folgenden Transkription der "späten" m-RNA kann sowohl vom Elternstrang als auch von den Tochtersträngen der viralen DNA abgelesen werden. Auch die Realisation der "späten" Gene hat für sich noch eine bestimmte zeitliche Abfolge, wobei der steuernde Regulationsmechanismus noch weitgehend unbekannt ist. Möglicherweise könnten Strukturproteine, welche von Virusgenen codiert wurden als Repressoren die Transkription oder Translation hemmen, indem sie sich an bestimmte Abschnitte der viralen DNA oder m-RNA binden. Virusspezifische regulatorische Proteine greifen auch in die Synthese der zellulären Makromoleküle ein und hemmen die DNA- RNA- und Proteinsynthese.

In der letzten Phase setzen sich aus den neusynthetisierten Virusbestandteilen neue Partikel zusammen, die dann die Wirtszelle verlassen. Der Zusammenbau kann im Zellplasma, an der Cytoplasmamembran, oder im Zellkern (Adenoviren) stattfinden.

Dann müssen die Virionen oft noch "reifen", bevor sie mehr oder weniger schnell an die Umgebung der Zelle abgegeben werden ("budding"). In einigen Fällen wird dabei die Zellmembran der Wirtszelle zerstört. Andere Viren reifen an der Zellmembran heran und die Partikel werden dann von der sich ausstülpenden Zellmembran umgeben; außerdem kann ihre Freisetzung die Beteiligung mehrerer Enzyme erfordern.
Zu den Viren, die bei Tieren Krebs auslösen und von denen man annimmt, daß sie auch beim Menschen Tumore erzeugen, gehören die aus der Herpes-Gruppe.

1.2.1. HERPESVIREN: EPSTEIN-BARR-VIRUS

Die umfangreichsten Hinweise dafür, daß ein Virus in die Krebsentstehung beim Menschen verwickelt ist, liegen beim Epstein-Barr-Virus (EBV) vor. Er ist auf der ganzen Welt verbreitet, und soweit serologische Tests durchgeführt werden konnten, besitzen fast alle Kinder in Afrika und viele in anderen Erdteilen in ihrem Blut Antikörper gegen das Virus (HENLE und HENLE 1969).

Von den amerikanischen Studenten besitzen beim Eintritt ins College 35-80% Antikörper gegen EBV. 10-15% der restlichen Studenten entwickeln jährlich die Antikörper und in etwa 60% dieser Fälle wird das von einer fieberigen, aber sonst meist komplikationslosen Erkrankung, der infektiösen Mononukleose (IM) begleitet. Die Viren werden durch engen Kontakt (Einatmen, Küßen, gemeinsame Speisen oder Getränke) übertragen. Nachdem sie durch den Mund oder die Atemwege in den Körper eingedrungen sind, befallen sie B-Lymphozyten mit denen sie im Lymphsystem zirkulieren. Nach 4-7 Wochen, während der akuten Phase der Krankeit, kann man bei fast allen Patienten Viruspartikel in den Speicheldrüsen entdecken (NIEDERMAN et al. 1976). Wenn diese Phase dann überwunden ist, bleibt eine andauerende Immunität zurück. Die Viren kommen aber in den B-Lymphozyten noch im latenten Zustand vor und werden nur in wenigen Zellen spontan aktiviert (EPSTEIN 1978). Man

glaubt, daß diese geringfügige Produktion neuer Viren dafür verantwortlich ist, daß andere noch nicht immunisierte Personnen, etwa über Speicheltröpfchen, infiziert werden. Einige Kliniker haben die IM als eine zum Stillstand kommende Leukämieform betrachtet, weil sich die Zahl der Leukozyten in der akuten Phase zwar vermehrt, im weiteren Verlauf aber wieder verringert (CARTER 1975). Obgleich das EBV aufgrund der serologischen und epidemiologischen Ergebnisse als Hauptursache der IM anerkannt wird, ist nicht viel darüber bekannt wie das Virus das Krankeitsbild hervorruft und wie das Immunsystem in der Lage ist die Vermehrung der Zellen, welche das EBV-Genom enthalten, einzuschränken (PAGANO 1977).

EPSTEIN und BARR (1964) isolierten das Virus ursprünglich aus einem Lymphosarkom, das Ende der fünfziger Jahre von BURKITT beschrieben worden war. Dieser Tumor kommt vorwiegend bei Kindern im Alter von 5-6 Jahren und geographisch begrenzt auf das Gebiet zwischen Uganda und Tansania vor (BURKITT 1970). Er tritt dort endemisch, aber recht selten auf (max. 15:100.000). Das Lymphom erscheint zuerst am Kiefer und als Target-Zellen für das Virus werden die Epithelzellen des Rachens und wie bei der IM die B-Lymphozyten genannt (PATTENGALE et al. 1974; JONDAL und KLEIN 1973; NIEDERMAN et al. 1976).
Das EBV konnte bisher nicht direkt aus den Tumoren isoliert werden. Seine Entdecker stellten aus einer Biopsie von BL-Patienten eine Lymphoblastenzellkultur her und beobachteten, daß die Zellen zunächst als Suspension, dann aber in Zellhaufen wuchsen. Darin konnten elektronenmikroskopisch Partikel entdeckt werden, die morphologisch den Viren der Herpesgruppe ähnelten. Inzwischen sind sie in den meisten Zellinien aus BL-Biopsien gefunden worden. Das Virusgenom wird aber in höchstens 10% der Zellen spontan aktiviert, die dann Partikel produzieren und lysiert werden. Diese neuen Viren können nicht infizierte B-Lymphozyten von antikörperfreien Spendern befallen und ein Teil von ihnen vermehrt sich dann lytisch weiter; der größere Teil transformiert die Zellen

aber, so daß sie in vitro unbegrenzt teilungsfähig werden (RICKINSON et al. 1977). Anhand der in vitro Teilungsfähigkeit von Zellen aus frischem Blut erkannte man, daß gesunde Personen mit latenter EBV-Infektion $1:10^7$ transformierte B-Lymphozyten besitzen, Patienten mit IM 1:5.000 und nicht infizierte Personen keine (ROCCHI et al. 1977).
Bei einem Primaten (Marmoset, Fam. Krallenaffen) konnte man durch Injektion von EBV oder von in vitro transformierten Lymphozyten eine lymphoproliferative Erkrankung auslösen (SHOPE et al. 1973).
Die transformierten Zellen des BL bilden virusspezifische Proteine gegen die dann auch Antikörper entstehen, wie z.B. das Epstein-Barr Nuclear Antigene (EBNA) im Zellkern. Andere virusspezifische Antigene werden kurz vor (D und R), oder erst kurz nach der Replikation gebildet (Virus-Capside-Antigene, VCA) (REEDMAN und KLEIN 1973). Sie können besonders gut mit der Immunofluoreszenztechnik nachgewiesen werden (HENLE und HENLE 1966). Serologische Untersuchungen in Afrika ergaben bei Patienten mit BL einen 8-10 mal höheren Titer an EBNA, D, R und VCA als bei verschiedenen Kontrollgruppen (HENLE et al. 1971).

Das EBV-Genom wurde im BL-Gewebe bei 117 von 120 afrikanischen Patienten mit Hilfe der Hybridisierungstechnik nachgewiesen (NONOYAMA und PAGANO 1971; LINDHAL et al. 1974). Eine kleine, noch nicht genau bestimmte Zahl von viralen DNA-Molekülen ist linear und kovalent in die DNA jeder befallenen Zelle integriert. Der größte Teil der viralen DNA läßt sich jedoch abtrennen, weil er sich in zirkulärer Form außerhalb der Chromosomen befindet, etwa vergleichbar den bakteriellen Episomen (ZUR HAUSEN et al. 1970a und b; ADAMS et al. 1973; KOLIAIS et al. 1978).Da die Virionen das Genom in linearer Form enthalten, muß es nach der Infektion, vermutlich durch zellulären Enzyme, zirkularisiert worden sein. Das EBV befindet sich so in einem latenten Zustand und wird erst schrittweise dereprimiert, wenn die Krebszellen im Kulturmedium wachsen. Zu diesem Entwicklungsprozeß lieferten weitere Experimente mit Zellkulturen wertvolle Hinweise.

Bei in vitro infizierten, noch nicht virusproduzierenden Lymphoblasten ergab die Hybridisierungsmethode, daß nur 3% der Virus-DNA für die Transkription zur Verfügung stehen. Dazu dient wahrscheinlich die durch alpha-Amanitin hemmbare RNA-Polymerase II im Zellkern (YOCUM und STROMINGER 1975; BEN-ZUR und BECKER 1977; HAYWARD und KIEFF 1976). Die EBNA-Synthese wurde schon 12-25 Stunden nach der Infektion festgestellt. EBNA kann sich an Zell-DNA binden unt steht im Verdacht regulatorisch wirksam zu sein. Etwa nach 20 Stunden treten die Zellen in die S-Phase ein, in der die EBV-DNA gleichzeitig mit dem größten Teil der zellulären DNA repliziert wird. Welche der drei bekannten zellulären Polymerasen dabei die eigentliche Replikase ist, ist noch unbekannt (HAMPAR et al. 1974; LUKA et al. 1977; EINHORN und ERNBERG 1978).
Bei verschiedenen Zellinien konnte man durch Argininmangel bzw. Cycloheximid- oder Puromycin- oder Joddesoxyuridin-Zugaben während der S-Phase den Abbau von Kernproteinen, vermehrte Produktion von EBV-Antigenen und Bildung von Viruspartikeln auslösen. Dadurch werden zelluläre RNA- und Proteinsynthese gehemmt und vielleicht können zelleigene regulatorische Proteine nicht gebildet werden, welche die Virusreplikation unter Kontrolle halten. Die Aktivität einer Thymidinkinase wird während der Virusreplikation gesteigert (HENLE und HENLE 1968; GLASER et al. 1973; HAMPAR et al. 1976).

In virusproduzierenden Zellen liegen die EBV-Genome dagegen linear vor und die gesamte genetische Information steht für die RNA- und Proteinsynthese zur Verfügung (HAYWARD und KIEFF 1976). Mit Phosphonoacetat (PAA) konnte die Replikation der EBV-DNA, die zur Virusproduktion führt, gehemmt werden, nicht aber die Replikation der zirkulären, latenten EBV-DNA. Da PAA die zellulären DNA-Polymerasen nur schwach hemmt, nimmt man an, daß die zirkuläre DNA von einer Zell-Polymerase und die lineare EBV-DNA von einer virusspezifischen DNA-Polymerase repliziert werden (SUMMERS und KLEIN 1976; NYORMOI et al. 1976). Die Induktion und Isolation dieses Enzyms gelangen

MILLER et al. (1977) bei BL-Hybridzellen, die mit Joddesoxyuridin behandelt wurden. Es befindet sich vorwiegend in der Kernfraktion und weist ähnliche Eigenschaften auf wie die DNA-Polymerasen aus dem Herpes-Simplex-Virus (POWELL und PURIFOY 1977) und wie eine EBV-spezifische Polymerase aus einem amerikanischen BL-Patienten (ALLAUDEEN und BERTINO 1978). Diese Enzymaktivität ist durch Stimulierbarkeit durch Mg^{++}-Ionen, $(NH_4)_2SO_4$ und HS-Gruppen, sowie durch PAA-Hemmbarkeit charakterisiert (HAUNG 1975).

Heute ist man davon überzeugt, daß das EBV maßgeblich an der Entstehung des BL beteiligt ist. Es gibt allerdings einige Argumente dafür, daß das Virus nicht für die Tumorentstehung verantwortlich ist, sondern nur die Transformation (als Grundvoraussetzung für die Weiterentwicklung zur Malignität) bewirkt. Das EBV ist nämlich weltweit verbreitet und das BL tritt geographisch gehäuft auf. Da die Malaria im gleichen Gebiet Afrikas verbreitet ist und durch diese Krankheit der Allgemeinzustand und das Immunsystem geschwächt werden, vermutet man, daß sich das Virus dadurch in anderer Weise entwickeln kann. Im Hochland Tansanias, wo weniger Einwohner mit Malaria infiziert sind, treten auch wesentlich weniger BL-Fälle auf als im Tiefland (DE THÉ 1979).
Bei den Infektionsbedingungen besteht ein bemerkenswerter Unterschied zur IM. Bei hoher Bevölkerungsdichte und schlechter Hygiene, wie z.B. in Entwicklungsländern, enthält das Serum schon bei 2-3 Jahre alten Kindern einen erhöhten Titer von Antikörpern gegen EBV. Wie kürzlich in Ghana durchgeführte Untersuchungen zeigen, handelt es sich, zunächst um eine stille Infektion, die keine klinischen Symptome hervorruft (FLEISHER et al. 1979; SHURIN 1979). Diese Erstinfektion tritt also auf, nachdem im kindlichen Organismus die von der Mutter erhaltene passive Immunisierung langsam nachläßt, und eigene Antikörper nicht ausreichend gebildet werden. So könnte aus der Transformation der unreifen B-Lymphozyten das BL entstehen. Dagegen kommt es in den weiterentwickelten Ländern oft erst im Jugend- oder Erwachsenenalter zur Erst-

infektion und dies scheint eher zur IM zu führen.
In den natürlicherweise entstandenen Zellen des BL findet man häufig eine Chromosomenaberration (Reziproke Translokation eines distalen Fragments der Chromosomen 8 und 14), die bei den in vitro transformierten Zellen und auch bei der IM nicht beobachtet wurde. Ihre Bedeutung ist noch unbekannt; vermutlich bietet sie solchen Zellen einen Selektionsvorteil (MANOLOV und MANOLOVA 1972; ZECH et al. 1976).
Weitere Unklarheiten bestehen darin, daß EBNA und DNA-Sequenzen des EBV, zwar bei 95% der afrikanischen aber nur bei etwa 20% der nicht afrikanischen BL-ähnlichen Lymphome nachgewiesen werden konnten (LINDHAL et al. 1976; ZIEGLER et al. 1976; JUDSON et al. 1977; BORNKAMM et al. 1980). Andererseits wurde über erhöhte Antikörpertiter gegen EBV bei chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), bei Hodgkin's-Krankheit und anderen Tumoren berichtet (ZUR HAUSEN 1976; PURTILO et al. 1981). Es wurden auch Retroviren (Typ C) in Gewebeproben aus BL entdeckt, die 70 S RNA mit homologen Sequenzen zu R-MuLV und außerdem die Enzymaktivität der Reverse Transkriptase enthielten (KUFE et al. 1973; PIZZO et al. 1981). Ähnliche Entdeckungen wurden auch schon in anderen Lymphomen beim Menschen gemacht (SPIEGELMAN et al. 1973), während man in Lymphomen, die in Primaten mit Herpesviren induziert wurden, keine Viruspartikel nachweisen konnte (LAUFS und STEINKE 1975). Es ist unter diesen Umständen noch sehr schwierig die Rolle des EBV bei der Entstehung des afrikanischen BL genau einzugrenzen.

Eine andere Krebsart des Menschen, die in Zusammenhang mit EBV steht, ist das Nasopharynx-Karzinom (NPC). Es ist ein undifferenzierter Tumor des Epithels. Wie das BL tritt auch das NPC bei einer ethnischen Gruppe stark gehäuft auf, nämlich bei den Chinesen in Südchina und Singapur. Dort entwickelt es sich in den meisten Fällen bei Erwachsenen (1:10.000). Epidemiologische und serologische Untersuchungen unterstützen die Annahme einer Verbindung zwischen EBV und NPC (DE THE´1974). Obwohl man sich noch nicht ganz sicher ist, ob das aus afrikanischem BL isolierte EBV und der

Erreger der IM wirklich vollständig identisch sind, ist es bemerkenswert, daß bei diesen beiden Krankheiten und bei NPC die gleichen Virusantigene (EBNA, D, R, VCA) nachzuweisen sind, nur in charakteristisch-unterschiedlicher Menge (HENLE und HENLE 1979).

In NPC wurde auch ein Virus nachgewiesen, das eine Lymphoblastenzellinie transformierte und dann daraus in Form von Partikeln isoliert werden konnte, die sich in ihren biochemischen und biologischen Eigenschaften nicht von EBV unterschieden, das aus Patienten mit BL oder IM isoliert worden war (CRAWFORD et al. 1979; BORNKAMM et al. 1980). Durch Hybridisierungsexperimente war das EBV-Genom in den Epithelzellen des Tumorgewebes, aber nicht in den Lymphoblasten der Patienten nachweisbar (WOLF et al. 1973). Das regelmässige gemeinsame Vorkommen scheint auch hier auf eine Beteiligung des EBV am NPC hinzuweisen. Darüberhinaus sind aber noch weitere Faktoren bekannt, welche die NPC-Entwicklung beeinflussen, darunter Umgebungseinflüsse sowie die genetisch bedingte Anfälligkeit der Population (HO 1972). Dies wird auch durch die Häufung des NPC innerhalb von Familien, die über 3-4 Generationen beobachtet wurden, bestätigt.

1.2.2. HERPESVIREN: HERPES SIMPLEX TYP 2

Eine weitere Tumorart beim Menschen, die unter Verdacht steht mit Viren, nämlich mit Herpes Simplex-2, in Verbindung zu stehen, ist das Cervixkarzinom. Viele Studien unterstützen die Hypothese, daß bei der Entwicklung dieses Tumors eine Infektion beteiligt ist. Vor allem besteht eine Korrelation zur sexuellen Aktivität. So ist die Häufigkeit der Krankheit bei Frauen, die häufig den Partner wechseln, wie z.B. bei Prostituierten, 4 bis 6 mal höher als bei Frauen mit begrenztem sexuellen Verkehr oder bei unberührten Frauen (PEREYRA 1961; KEIGHLY 1968). Auch das Alter kann eine Rolle spielen, denn bei Frauen, die jung geheiratet haben und frühzeitig schwanger wurden, oder ein geringes

Alter zur Zeit des ersten Koitus hatten, ist das Risiko an diesem Tumor zu erkranken ebenfalls erhöht (NAHMIAS und NORRILD 1980). Zur Risikogruppe gehören auch Frauen, die zum zweiten Mal verheiratet sind, oder deren Ehemann ein Peniskarzinom hat, oder deren Ehemann schon vorher mit einer Frau verheiratet war, die an Cervixkarzinom verstorben ist (MARTINEZ 1969; KESSLER 1976). All dies deutet darauf hin, daß für die Entstehung dieser Tumore ein Faktor verantwortlich ist, der auf geschlechtlichem Wege übertragen wird und daß Männer existieren könnten, die den Faktor mit grosser Wahrscheinlichkeit übertragen (SINGER et al. 1976; KESSLER 1976). Die Natur dieses Faktors ist unbekannt. Transformationsexperimente machen aber sehr wahrscheinlich, daß es sich um die DNA eines Virus oder des Spermas handelt RAPP und WESTMORELAND 1976).

Es ist bekannt, das HSV-2 die Genitalien infiziert und der Cervixbereich häufig der Ort der viralen Replikation ist. Das Virus wird gewöhnlich auch beim Geschlechtsverkehr übertragen. Außer den epidemiologischen Daten existieren weitere Beziehungen zwischen HSV-2 und dem Cervixkarzinom. Bei serologischen Studien wurden im Serum von Patienten mit Cervixtumor häufig Antikörper gegen HSV-2 gefunden und zwar gegen das spezifische Strukturprotein AG-4 des Virus und ein anderes mit den Tumor assoziertes Antigen (HSV-TAA) (NOTTER und DOCHERTY 1976), sowie gegen ein frühes Nichtstrukturprotein (VP 134) (MELNICK et al. 1976). Mit Hilfe von HSV-2-transformierten Zellen wurden in vitro noch weitere virusspezifische Proteine nachgewiesen, nähmlich eine Thymidinkinase und mehrere Glycoproteine (RAPP und WESTMORELAND 1976).

Der direkte Nachweis von HSV-2 Nukleinsäuren ist in menschlichen Gewebeproben bis heute fast ohne Erfolg geblieben. Nur in einem Fall wurde durch Hybridisierung zwischen DNA aus einer Tumorbiopsie und markierter DNA aus HSV-2 die Anwesenheit von Virussequenzen im Gewebe nachgewiesen (FRENKEL et al. 1972). Häufiger gelang der Nachweis bei Kulturen mit den transformierten Zellen. Die daraus gewonnene

DNA enthält virusspezifische DNA in unterschiedlicher Menge und zwar 3-32% des HSV-2 Genoms im 1-5 Kopien (FRENKEL et al. 1976). Dazu ist bekannt, daß nicht notwendigerweise das gesamte Virusgenom in den Zellen vorhandensein muß, um die Transformation zu bewirken. Einige Fragmente viraler Nukleinsäuren, die eine onkogene Transformation auslösen können, wurden kürzlich kartiert (JARIWALLA 1981; GALLOWAY und MC DOUGALL 1981).

HSV-2 ist in der Lage sich in Zellkulturen aus menschlichem Gewebe und auch in tierischen Zellen durch eine lytische Infektion zu vermehren. Bestrahlt man die Viren aber vor der Infektion mit ultraviolettem Licht, oder inkubiert man die infizierten Zellen bei erhöhter Temperatur, welche die Replikation der Viren begrenzt, so werden die Zellen vor der Zerstörung durch die Viren bewahrt. Unter diesen Bedingungen treten dann aber mehr transformierte Zelle auf, wie an Kulturen mit Mäusen-, Ratten-, Hamster- und menschlichen Zellen gezeigt wurde. Solche Zellen erzeugten auch Tumoren, als sie den Spendertieren wieder injiziert wurden (DUFF und RAPP 1971; DARAI und MUNK 1973).
Die in vivo Infektion mit HSV-2 führt in der Regel ebenfalls zu einer lytischen Vermehrung und meistens zum Tod der Labortiere. Werden Mäuse jedoch mit inaktiviertem HSV-2 immunisiert und dann wiederholt HSV-2 und Hormone in die Vagina appliziert (MUÑOZ 1973), oder erfolgt die intravaginale Infektion über längere Zeit mit formalinbehandelten Viren (WENTZ et al. 1975), so steigt die Häufigkeit des Cervixkarzinoms an.
Ein anderes interessantes Problem besteht darin, daß viele Frauen mit HSV-2 infiziert sind ohne Krebs auszubilden. Hier besteht noch ein Mangel an Erkenntnissen über die Cofaktoren und die individuellen Veranlagungen, die bei der Entstehung der Krankheit von Bedeutung sind (RAPP und REED 1977). Auch die Rolle der Hormone muß beachtet werden, da Östrogene die Tumorhäufigkeit in Experimenten mit Labortieren erhöhen.
Auch die lange Latenzperiode, während der sich das Virus in

den peripheren Ganglien befindet, unterscheidet die HSV-2-Infektion von den meisten anderen Viruserkrankungen. Außerdem stehen mit der HSV-2-Infektion ganz verschiedene Krankheitsbilder in Zusammenhang (MELNICK und ADAM 1978). Indem weitere Daten zur Epidemiologie, zur Serologie und zur Bioregulation bei der Transformation sowie über neue Tiermodelle mit HSV-2 bereitgestellt werden, wird man seinen Einfluß auf das Cervixkarzinom besser beurteilen können.

1.3. ONKOGENESE DURCH RETROVIREN BEI TIEREN

1.3.1. MORPHOLOGIE DER RETROVIREN

Die Retroviren sind von kugelförmiger Gestalt mit etwa 100 nm Durchmesser und werden nach ihrer elektronenmikroskopischen Struktur klassifiziert (GILLESPIE et al. 1975):

A-Typ Partikel

Sie kommen in Cytoplasma vor. Während der Reifungsphase bildet sich das membranumhüllte Nukleoid, das durch Knospung der Zellmembran von einer weiteren Hülle umgeben werden kann ("coated particles A"). Sie werden in der Regel in normalen Geweben beobachtet und gar nicht aus der Wirtszelle freigesetzt und besitzen auch keine nachweisbare biologische Aktivität. Man glaubt, daß sie im Zusammenhang mit einem Mechanismus für die Aktivierung von Genen stehen. Aus genetischen Modifikationen dieser Partikel könnten die Viren des Typs B oder des Typs C hervorgegangen sein; sie werden häufig auch als Vorstufen von B-Typ Viren betrachtet.

B-Typ Partikel

Sie haben ein dichtes exzentrisches Nukleoid. Die äußere Hülle ist vom Nukleoid deutlich abgesetzt und trägt 5-10 nm lange Fortsätze. Man findet sie in intrazellulären Spalten, aber auch in einigen intrazellulären Einschlüssen von Tumorzellen. Zu ihnen zählt der Erreger des Mammatumors bei der Maus (MuMTV).

C-Typ Partikel

Ihr Nukleoid ist von einer losen Hülle umgeben, die kürzere Fortsätze tragen kann. Es erscheint elektronenoptisch weniger dicht, solange die Viren noch unreif sind und verdichtet sich, wenn sie freigesetzt werden. Sie stellen die Mehrheit der Retroviren dar.

D-Typ Partikel

Die extrazellulären Partikel besitzen eine Hüllmembran und ein exzentrisches Nukleoid, das sich auch erst während eines Reifungsvorgangs verdichtet und dabei zylindrische Gestalt annimmt. Die Fortsätze der Außenhülle sind kurz. Diese Viren wurden in Neu- und Altweltwaffen gefunden und ein typischer Vertreter ist das Mason-Pfizer Virus (MPV) (SCHLOM et al. 1977).

1.3.2. B-TYP PARTIKEL UND MAMMATUMORE BEI TIEREN

MURRAY wies 1911 bei einem Mäusestamm nach, daß die weiblichen Tiere signifikant häufiger von Brustkrebs befallen werden als bei anderen Mäusestämmen. Es zeigte sich später bei Kreuzungsexperimenten, daß die Tumorhäufigkeit vor allem von der Herkunft der Mütter aus einem karzinombelasteten Stamm abhing und 1936 entdeckte BITTNER in der Milch dieser weiblichen Mäuse einen Brustkrebs erregenden Faktor. Nachdem sein Vorkommen auch in vielen Organen nachgewiesen war, wurden im Mammakarzinom der Mäuse elektronenmikroskopisch Viruspartikel vom B-Typ gefunden (BERNHARD 1960). Die MuMTV-Partikel kommen auch bei den Männchen vor, ohne daß diese einen Tumor entwickeln. Sie können mit dem Sperma auf die Weibchen übertragen werden und weiter mit der Milch, die 10^9-10^{12} Partikel/ml enthalten kann, auf die Neugeborenen. Tumoren entwickeln sich aber erst bei älteren Tieren von 8-20 Monaten.

Bei künstlicher Infektion mit den Viren erweisen sich manche Mäusestämme als resistent und entwickeln nur wenige Partikel. Andererseits werden B-Typ Partikel auch in der Milch bei Stämmen mit natürlicherweise geringer Mammatumorfrequenz nachgewiesen (BENTVELZEN 1968). Die Tumorentstehung hängt

auch von der genetischen Disposition ab; dies wurde durch Kreuzungsexperimente belegt (BENTVELZEN et al. 1972). Außerdem spielen der Differenzierungszustand der Brustdrüse und hormonelle Faktoren eine Rolle.
Neben B-Typ Viren sind in Mammatumoren auch häufig C-Typ Viren gefunden worden, aber für MuMTV sind die B-Typ Partikel charakteristisch (LYONS und MOORE 1965). MuMTV aus Mäusemilch enthält eine Reverse Transkriptase (DION et al. 1977), die isoliert und charakterisiert wurde (vergl. Abschnitt 1.5.).
Hybridisierungsexperimente ergaben, daß MuMTV keine homologen Sequenzen mit anderen bekannten Retroviren besitzt. Dagegen enthalten alle Zellen bei Mäusen MuMTV-Sequenzen und zwar schätzt man, daß 5-10 MuMTV-Genome als Provirus vorhanden sind (MORRIS et al. 1977).

Auch in einem spontanen Mammatumor eines Rhesusaffen wurde ein Retrovirus entdeckt (MPV). Es enthält 60-70 S RNA sowie Reverse Transkriptase und wird wegen seiner Morphologie und serologischen Verschiedenheit von MuMTV u.a. Viren als D-Typ Virus charakterisiert (CHOPRA und MASON 1970; KRMARSKY et al. 1971; NOWINSKI et al. 1971; SCHLOM und SPIEGELMAN 1971).

1.3.3. C-TYP PARTIKEL UND VERSCHIEDENE TUMORE BEI TIEREN

Die krebserregenden Viren vom C-Typ verursachen bei vielen Tierarten unterschiedliche Tumore der mesenchymalen Gewebe wie z.B. Sarkome, akute Leukämie oder chronische Leukämie. Auch bei Primaten, wie dem Gibbon und dem Wollaffen, sind solche Viren als natürliche Ursachen von Tumoren nachgewiesen worden (NOOTER und BENTVELZEN 1980).
Die Übertragung der Krankheiten ist bei den Tiermodellen gut untersucht, vor allem bei Katzen und Mäusen. Bei FeLV handelt es sich um ein exogenes Retrovirus, welches bei Hauskatzen nicht-maligne Erkrankungen auslöst, die sich zum Krebs entwickeln können. Es scheint, daß die Infektion mit dem Speichel oder mit dem Kot horizontal übertragen wird und sie

wird nur bei 30% der Katzen chronisch (HARDY 1980). Bei 40% der Tiere entwickelt sich auf natürlichem Wege eine Immunität, die dem Organismus die Fähigkeit verleiht der Ansteckung zu widerstehen. Die restlichen 30% bleiben ansteckungsfähig bis zu einer späteren, erneuten Infektion. Die Infektionshäufigkeit ist also sehr viel höher, als die Häufigkeit manifester Tumore. Dies läßt vermuten, daß noch andere Faktoren in die Entstehung der Leukämie durch FeLV bei Katzen eingreifen, bzw. das die krebsauslösenden Virusgene nur mit begrenzter Wahrscheinlichkeit in den aktiven Zustand gelangen.

Die Viren, die bei Hühnern, Mäusen und Katzen chronische Leukämie oder Lymphosarkome hervorrufen, durchlaufen zunächst eine sehr lange Latenzperiode, während der sie sich in ihren Wirten vermehren bis hohe Titer erreicht werden.

Dagegen haben die Viren der akuten Leukämie Replikationsdefekte d.h. sie besitzen nicht alle virale Gene in ihrem Genom, die zur Replikation notwendig sind. Sie können sich daher nicht ohne die Hilfe eines anderen Virus (Helpervirus) vermehren, der ihnen einige der an der Replikation beteiligten Proteine zur Verfügung stellt. Sie induzieren lymphatische Krebskrankheiten bei Hühnern und Mäusen, die nach einer kurzen Latenzzeit ausbrechen (DUESBERG und VOGT 1979). Ausserdem besitzen sie die Fähigkeit Fibroblastenzellen in vitro zu transformieren.

Bei den akuten Sarkomen wurden Retroviren aus Vögeln, Mäusen, Katzen, Ratten und auch aus wenigen Primaten isoliert und auch diese sind replikationsdefekt (Ausnahme RSV). Auch sie können in vitro Fibroblasten transformieren.

1.3.4. REPLIKATION DER RETROVIREN

1.3.4.1. ENTWICKLUNG DER MODELLVORSTELLUNGEN

Da die Retroviren als genetisches Material nur RNA enthalten, stellten sie für lange Zeit ein biologisches Rätsel dar, weil man nicht verstehen konnte, wie ihre Erbinformation vermehrt

wird. Nach dem sogenannten zentralen Dogma der Molekularbiologie, war die Übermittlung der Erbinformation nur von der DNA zur DNA oder zur RNA hin möglich.
HUEBNER und TODARO stellten 1969 ein Modell zur Vermehrung dieser Viren auf. Sie nehmen dabei an, daß alle Körperzellen einer Tierart, d.h. Soma- und Keimbahnzellen, in den Chromosomen endogene virale Gene besitzen (onkogen-virogen-Modell). Diese sollen normalerweise inaktiv sein und durch genetische Einflüsse in den Zellen (Differenzierungsvorgänge, Hormone), oder aus der Umwelt (andere Viren, energiereiche Strahlungen, karzinogene Substanzen) aktiviert werden. Indem sie in virale RNA transkribiert werden, sollen sie die Proteinsynthese ermöglichen, die virusspezifische Antigene und komplette Viruspartikel hervorbringt, welche dann in der Lage sind die Transformation auszulösen.
1964 entwickelte TEMIN die Hypothese, daß das Genom der Retroviren in einen entsprechenden DNA-Abschnitt transkribiert wird, wobei sich zunächst ein RNA-DNA Hybrid bildet. Dieses soll durch die enzymatische Aktivität einer viralen RNase H (Ribonuklease) gespalten und mit Hilfe einer zellulären DNA-Polymerase zum DNA-DNA Doppelstrang vervollständigt werden. Dieser sogenannte Provirus soll dann ganz oder teilweise in ein Chromosom der Wirtszelle integriert werden können. In dieser Form könnte die virale genetische Information solange latent bleiben, bis sie durch die oben erwähnten Einflüsse aktiviert würde (Protovirus-Modell). Dieses Modell erhielt starke Unterstützung als 1970 TEMIN und MIZUTANI und unabhängig davon BALTIMORE endeckten, daß die infektiösen Partikel des Rous Sarkom Virus (RSV) ein bis dahin unbekanntes Enzym enthalten, das Reverse Transkriptase genannt wurde. Es ist in der Lage aus Desoxyribonukleotidtriphosphatmolekulen als Substrat, eine DNA-Kette aufzubauen, deren Basensequenz komplementär zu einem gleichzeitig vorhandenen viralen RNA-Template ist. Später wurde diese Enzymaktivität auch bei den anderen tumorerregenden Retroviren nachgewiesen.

1.3.4.2. MECHANISMUS DER REVERSEN TRANSKRIPTION

(PROVIRUS BILDUNG)

Im Laufe der letzen zwei Jahre ist es gelungen Nukleotidsequenzen bei mehreren Retroviren (z.B. ASV, Mo-MuLV, Mo-MuSV, MuMTV) aufzuklären, nachdem man die Proviren durch Genklonierung vermehren konnte. Zwischen dem Aufbau des Virusgenoms und dem Verlauf der reversen Transkription besteht ein komplexer Zusammenhang (SUTCLIFFE et al. 1980; VAN BEVEREN et al. 1980; DHAR et al. 1980; JU und SKALKA 1980; YAMAMOTO et al. 1980; REDDY et al. 1980; SHIMOTOHNO et al. 1980; SWANSTROM et al. 1981; MAJORS und VARMUS 1981; DONEHOWER et al. 1981; VARMUS 1982).

Primärstruktur und Genomabschnitte der Virus-RNA

Das Genom der Retroviren, die 70 S RNA ist ein Dimer aus zwei identischen 35 S Untereinheiten von etwa 9.000 Nukleotiden Länge, die nahe ihrem 5´-Ende durch Wasserstoffbrücken miteinander verknüft sind. Die Molekülmasse der Untereinheiten beträgt etwa 3,1 x 10^6. Außerdem werden in C-Typ Partikeln auch 4 S, 18 S und 28 S RNA´s gefunden, die wahrscheinlich zellulärer Herkunft sind (BILLITER et al. 1974; BEEMON et al. 1974; KING 1976; BENDER und DAVIDSON 1976; WANG 1978; BENDER et al. 1978). Abb. 1 zeigt schematisch die Ergebnisse der Genkartierung des Genoms der Retroviren: beginnend am 5´-Ende einer RNA-Untereinheit findet man in 3´-Richtung zunächst eine "Cap"-Struktur aus m(7)-Guanin-Tetraphosphat und danach ein GMP, wie bei der eukaryontischen mRNA. Es folgt ein kurzer "terminal repeat"-Abschnitt (tr) aus 16-79 Nukleotiden und darauf eine Sequenz von 78-120 Nukleotiden (u_5), die mit zwei UMP-Nukleotiden endet. Beim Erreger des Mammakarzinoms der Mäuse (MuMTV) stehen statt dessen ein GMP und ein CMP (DONEHOWER et al. 1981).
Die nächsten 18-21 Nukleotide stellen einen Initiator-Abschnitt für die DNA-Synthese dar (pbs = "primer binding site"). Er ist komplementär zum 3´-Ende bestimmter tRNA´s der Wirtszellen z.B. $tRNA^{(trp)}$ bei RSV und AMV, $tRNA^{(pro)}$ bei Mo-MuLV sowie $tRNA^{(lys)}$ bei MuMTV. Diese 4 S RNA´s kommen fest an die 70 S RNA gebunden auch in den Viruspartikeln vor

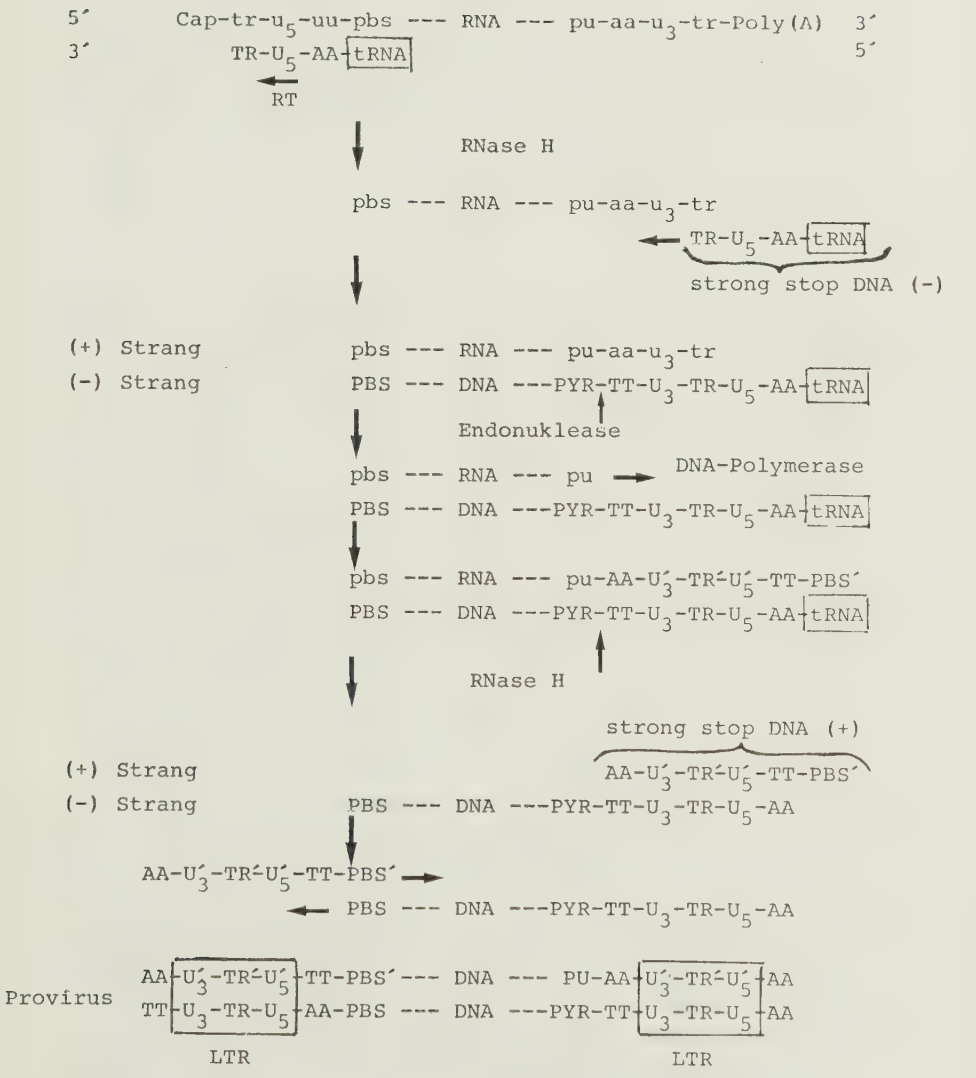


ABBILDUNG 1: PROVIRUSBILDUNG BEI RETROVIREN

(DAHLBERG et al. 1974; WALTERS et al. 1975; PETERS und GLOVER 1980).
Dann folgen die Strukturgene für die virusspezifischen Proteine (gag, pol, env, src). Dahinter befinden sich mehrere Purinbasen (pu), dann zwei AMP-Reste und dann eine weitere Nukleotidsequenz (u_3). Am 3'-Ende befindet sich wieder wie am 5'-Ende ein kurzer "terminal repeat"-Abschnitt und dann wie bei der eukaryontischen mRNA eine Poly(A)-Sequenz von etwa 180 Nukleotiden.

Synthese linearer doppelsträngiger Virus-DNA

Wesentliche Phasen der reversen Transkription waren schon in vielen Laboratorien untersucht worden, als man mit Hilfe von Sequenzierungsdaten begann den Mechanismus zu verstehen (TAYLOR 1977; WEINBERG 1977; BISHOP 1978). Als Transkript fand man im Zellplasma lineare doppelsträngige DNA, die aber länger ist als das virale RNA-Template, weil sie an den Enden der Doppelhelix "Long Terminal Repeat"--Abschnitt (LTR) enthält (HSU et al 1978; SHANK et al. 1978; GILBOA et al. 1979; COFFIN 1979). Diese bestehen aus den Sequenzen U_3-TR-U_5 und sind bei den verschiedenen Viren unterschiedlich lang (etwa 325-1300 Basenpaare), vor allem im Bereich U_3 (HISHINUMA et al. 1981). Ihre Entstehung und ihre Bedeutung für den Ablauf der Transkription gibt Abb. 1 in einem detaillierten Modell wieder (TEMIN 1981). Da unbekannt ist, ob die beiden 35 S Untereinheiten dabei zusammenwirken, wurde das Modell nur für das haploide RNA-Genom aufgestellt.
Zunächst lagert sich am pbs-Abschnitt, in der Nähe des 5'-Endes der RNA, das komplementäre 3'-OH-Ende einer bestimmten zellulären tRNA an. Sie dient als Primer an dem die Synthese des (-)Stranges der Provirus-DNA beginnt. Die RNA abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) transkribiert nun die Sequenz uu-u_5-tr in AA-U_5-TR und zwar von 3'- in 5'-Richtung. Man bezeichnet das Stück als "strong stop minus DNA".
Dann wird der RNA-Abschnitt tr-u_5-uu am 5'-Ende mit Hilfe einer Exonukleaseaktivität (RNase H), die mit der Reverse Transkriptase assoziiert ist, abgebaut. Das entstandene Stück

viraler (-)Strang-DNA wird anschließend mit dem daranhängenden tRNA-Primer auf das 3´-Ende der Virus-RNA übertragen, indem sich die kurzen "terminal repeat"-Abschnitte paaren. Das TR-Ende der "strong stop minus DNA" dient dann wieder als Primer für die Reverse Transkriptase, damit der (-)Strang der Virus-DNA von 3´- in 5´-Richtung vervollständigt werden kann.
Durch eine Endonuklease (RNase H) wird nun die Virus-RNA am 3´-Ende zwischen der Purinsequenz und den beiden Adeninnukleotiden gespalten und die verbliebenen Purinnukleotide können als Primer für die Synthese der (+)Strang-DNA dienen. Dies ist anfangs DNA-abhängige und am Ende RNA-abhänige DNA Synthese. Ob dabei zwei Polymerasen beteiligt sind, ist noch nicht bekannt. Jedenfalls wird die komplementäre Sequenz $AA\text{-}U_3'\text{-}TR'\text{-}U_5'\text{-}TT\text{-}PBS'$ ("strong stop plus DNA") gebildet. Nachdem durch Exonuklease (RNase H) die tRNA am 5´-Ende des (-)Stranges und auch das 5´-Ende der viralen RNA abgebaut wurden, kann dieser "strong stop plus DNA"-Abschnitt auf das 3´-Ende des (-)Stranges übertragen werden, indem sich die PBS´-Sequenz mit der komplementären PBS-Sequenz paart. Diese beiden Sequenzen können nun wieder als Primer der DNA-Synthese in 3´⟶5´-Richtung dienen. Dann ist die doppelsträngige, nicht integrierte Virus-DNA fertiggestellt.

Integration der Virus-DNA (Provirus) ins Wirtsgenom

Die doppelsträngige lineare Virus-DNA (Abb. 1) ist der Vorläufer von zirkularisierten Formen, die im Kern infizierter Zellen gefunden wurden (SHANK et al. 1978; SHANK und VARMUS 1978; YOSHIMURA und WEINBERG 1979).
Kleinere Ringformen kommen 2-3 mal häufiger vor als Größere. Sie sind 6-7% kürzer als die lineare Form, weil sie nur eine (oder keine) LTR-Sequenz enthalten. Man nimmt an, daß diese Deletion an einem Ende der viralen DNA entsteht, während sich der Ring durch eine intramolekulare Rekombination zwischen den Strangenden bildet.
Die größeren Ringformen enthalten zwei LTR-Sequenzen und scheinen in mehreren Varianten aufzutreten. Die häufigste

hat etwa die gleiche Länge und Struktur wie die nicht integrierten linearen Moleküle. Andere Moleküle enthalten verschiedenartige Deletionen oder Inversionen in den Regionen zwischen den LTR-Sequenzen. Man vermutet, daß im Ringmolekül Rekombinationen auftreten können, die entweder zwei kleine Ringe hervorbringen, oder eine Inversion im Vergleich zur Richtung der LTR-Sequenzen (SHOEMAKER et al. 1980; JU et al. 1980; HIGHFIELD et al. 1980; SWANSTROM et al. 1981).

Die Provirus-DNA findet man zwischen zwei LTR-Abschnitten in die Wirts-DNA integriert. Der Vergleich von klonierten und sequenzierten LTR-Fragmenten von nicht integrierter linearer Virus-DNA mit diesen integrierten Proviren ergab weiter, daß beim Provirus an beiden Seiten zwei Basenpaare (AA x TT) fehlen. Außerdem bilden bei jedem LTR die ersten und die letzten 6-12 Basenpaare ein "inverted Repeat" (IR). Deshalb vermutet man, daß die fehlenden Basenpaare auch Teil von IR´s sind und beim Integrationsvorgang verloren gehen. Ein Ausnahme bildet darin das MuMTV (DHAR et al. 1980; SHOEMAKER et al. 1980). Die IR´s sind analog zu den Transposon-Elementen aufgebaut, die bei Eukaryonten und Prokaryonten vorkommen (CALOS und MILLER 1980; FARAUGH und FINK 1980; GAFNER und PHILIPPSEN 1980).
Bemerkenswert sind auch die sich wiederholenden Sequenzen der Zell-DNA ("directed Repeat", DR) von denen man je nach Virusart 4-6 hinter dem LTR findet und die vermutlich während der Integration ins Wirtsgenom entstehen.

Auf der Basis dieser Entdeckung schagen SHOEMAKER et al. (1980) zwei Modelle für den Integrationsvorgang vor (Abb. 2). Für das erste Modell wird nur eine LTR-Sequenz im Präkursor angenommen. Es postuliert die Anwesenheit einer Endonuklease, die eine mehr oder weniger spezifische Sequenz der Wirts-DNA erkennen und versetzt aufspalten kann. Der LTR-Abschnitt soll an seinen beiden Enden je eine einsträngige Läsion erhalten. Dann könnten die Strangenden der Wirts-DNA mit der Virus-DNA 5´-3´ bzw. 3´-5´ durch eine Ligase verbunden werden. Wenn sich die Wasserstoffbrücken des LTR-Abschnitts öffnen, können

die fehlenden komplementären Abschnitte durch Reparaturenzyme ergänzt werden und es ist die integrierte Form der Provirus-DNA entstanden, die an beiden Enden einen LTR-Abschnitt trägt.

Das zweite Modell geht von großer zirkulärer Virus-DNA aus, die zwischen zwei LTR-Abschnitten zum Ring geknüpft ist. Eine hypothetische Endonuklease könnte diese Stelle versetzt spalten, genauso wie die Wirts-DNA. Nach der kreuzweisen Fusion der Strangenden sind einige gegenüberstehende Basen vorhanden, die nicht paaren können. Ein Reparatursystem müßte sie in dem einen Strang entfernen und die Lücke komplementär schließen.

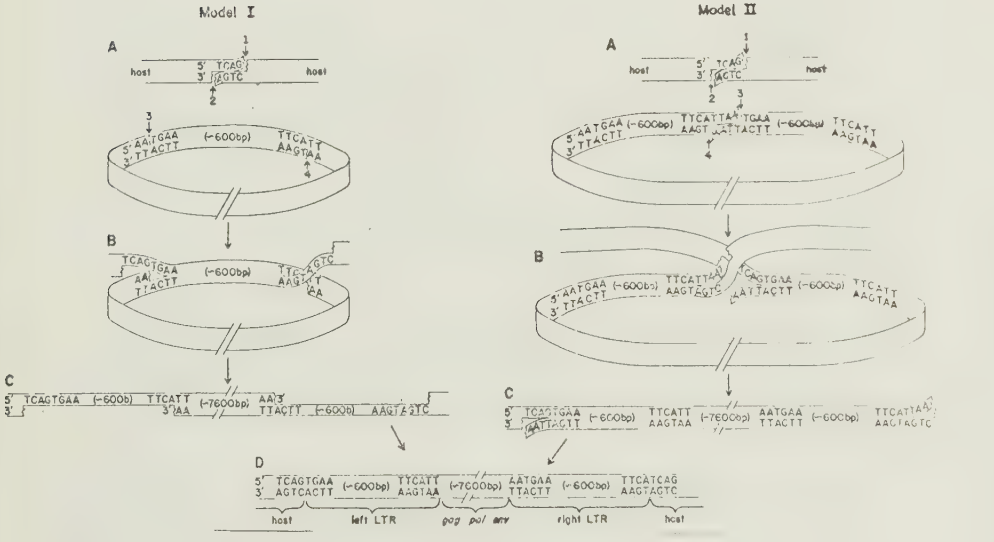


ABBILDUNG 2: MODELL ZUR INTEGRATION DES PROVIRUS IN DIE WIRTS-DNA (aus SHOEMAKER et al. 1980).

Bis heute ist noch nicht nachgewiesen, welche Form der viralen DNA (lineare, kleine oder große Ringform) wirklich der Präkursor der integrierten Form ist (HUGHES et al. 1978; RINGOLD et al. 1979; COHEN et al. 1979). Die Beobachtung von GUNTAKA et al. (1975), daß Ethidiumbromid, vermutlich durch Interkalation die Bildung geschlossener Ringformen hemmt und gleichzeitig die Integration der Provirus-DNA sowie die Virusproduktion verhindert wird, gibt jedoch einen Hinweis, daß die intrazellulären Ringformen bei Retroviren die gleiche Bedeutung haben wie beim EBV.
Auch die Funktion der LTR´s im Entwicklungszyklus der Retroviren ist noch nicht ganz klar. Es wird angenommen, daß die IR´s,die als Teile der LTR´s vorkommen, Promotorsequenzen für die Transkription der benachbarten Strukturgene enthalten. Andere Stellen könnten Stop-Signale für die Transkription enthalten.
Die viralen DNA-Kopien werden an mehreren Stellen in die Chromosomen einer Wirtszelle eingebaut. Eine kleine Region der Präkursor-Moleküle (~50 Nukleotide) scheint sich an die Wirts-DNA anlagern zu können und damit die Integrationsorte zu bestimmen. Vielleicht liegen die Anlagerungsbereiche auf der linearen Virus-DNA an den beiden äußeren Enden, so daß sie nach der Ringbildung zusammenwirken können (KESHET und TEMIN 1978; STEFFEN und WEINBERG 1978; COHEN et al. 1979; HUGHES et al. 1978; SABRAN et al. 1979).

Das Provirus kann nun als Template für die Synthese viraler RNA dienen. BISHOP (1978) fand Hinweise dafür, daß das Primärtranskript einer Untereinheit des RNA-Genoms entspricht.

1.3.4.3. DIE GENPRODUKTE DER RETROVIREN

Das Genom der Retroviren enthält vier verschiedene Genregionen. Von 5´- in 3´-Richtung sind dies:
gag, codiert für Strukturproteine des Virions (Core), darunter gruppenspezifische Antigene;
pol, codiert für die Reverse Transkriptase;
env, codiert für die Hülle des Virions (envelope, Glykopro-

tein);

onc, RNA-Sequenz, die für die Transformation der Zelle notwendig ist (DUESBERG und BISTER 1980).

Die Synthese der viralen Proteine findet an verschiedenen Messengern statt (VAN ZAANE et al. 1977; PHILIPSON et al. 1978; STACEY und HANAFUSA 1978; MURPHY et al. 1979). Es scheint, daß die 35 S Untereinheit des Genoms zunächst für zwei Polypeptide codiert: Pr^{gag} und $Pr^{gag-pol}$ (KERR et al. 1976; PATERSON et al. 1977; MURPHY et al. 1979; MURPHY und ARLINGHAUS 1978). Früher wurde schon bekannt, daß in virusinfizierten Zellen oder in reifen Viren die Core-Proteine etwa 20-25 mal häufiger vorkommen als die Reverse Transkriptase (CHEN und HANAFUSA 1974; PANET et al. 1975; OPPERMAN et al. 1977; JAMJOOM et al. 1977). Es muß deshalb ein Mechanismus existieren, der dieses Verhältnis steuert. Tatsächlich konnte man bei einem in vitro Translationssystem bei Mäusen durch die Zugabe von Suppressor-$tRNA^{ser}$ für das amber-Codon die Synthese eines größeren Polypeptides als Pr^{gag} stimulieren (PHILIPSON et al. 1978; MURPHY et al. 1980). Bei einem ASV-System gelang dies allerdings nicht (WEISS et al. 1978). Das Vorhandensein des amber-Codons am Ende des gag-Gens wurde durch die Sequenzierung des Provirus bei Mo-MuLV und Mo-MuSV bestätigt (VAN BEVEREN et al. 1981). Man nimmt an, daß eines von 20-25 Ribosomen während der Translation dieses Stop-Signal überspringen kann und $Pr^{gag-pol}$ produziert. Dieser Präkursor wird in Pr^{pol} (RT) und 4 weitere Polypeptide gespalten, die am Aufbau des Virus-Cores beteiligt sind (EISENMAN und VOGT 1978; STEPHENSON et al. 1979).
Eine zweite mRNA (22 S) codiert bei den Mäusenviren für das Genprodukt von env, Pr^{env}. Bei aviären Viren wurden 21 S bzw. 28 S mRNA gefunden, die vermutlich nicht codierende Sequenzen und die Abschnitte env-src bzw. src enthalten (s.u.)

Es scheint also, daß polycistronische RNA (35 S) im Zellkern gebildet wird, aus der dann teilweise die mRNA für Pr^{env} herausgespalten wird, und daß der Rest der RNA ohne weitere

Veränderung ins Cytoplasma gelangt (HAYWARD 1977; STACEY et al. 1977; STACEY und HANAFUSA 1978; PURCHIO et al. 1978).

Das onc-Gen wurde durch die Existenz von transformationsdefekten Mutanten und erfolgreiche Rekombinationsexperimente mit ihnen endeckt (MARTIN und DUESBERG 1972; BEEMON et al. 1974; WANG 1978). Es existieren je nach Virusart verschiedene Typen (z.B. src bei RSV), die sowohl virusspezifische gag-oder pol-Sequenzen, als auch zellspezifische Sequenzen enthalten. Die einzige bisher bekannte Funktion der onc-Gene ist die Transformation. Selbst das Genom einer Defektmutante von RSV (gag^-, pol^-, env^-) reicht zur Transformation und Sarkominduktion aus. Die src-mRNA enthält aber auch noch die Sequenzen vom 3'- bzw. 5'-Ende des Genoms, die an der Transformation beteiligt sein könnten (MELLON und DUESBERG 1977). Im Falle des gut untersuchten RSV gibt es einen Hinweis auf ein vom src-Abschnitt codiertes Protein in transformierten Zellen (BRUGGE und ERICKSON 1977).
Den meisten stark onkogenen Retroviren der akuten Leukämie und Sarkome (Ausnahme RSV) fehlen essentielle Virusgene vermutlich teilweise oder ganz (gag^-, pol^-, env^-, onc^+). Dies könnte die Ursache dafür sein, daß manche Retroviren replikationsdefekt sind und keine Partikel erzeugen. Die Gene solcher Viren können nur mit Hilfe zufällig anwesender, nicht defekter, "Helperviren" (z.B. denen der Leukose oder der lymphatischen Leukämie) repliziert werden und in neue Virionen gelangen (DUESBERG und BISTER 1980).

1.3.5. MÖGLICHE HERKUNFT UND BEDEUTUNG DER RETROVIREN

Retroviren wurden bei kaltblütigen Wirbeltieren, Vögeln, Saugern und nicht menschlichen Primaten nachgewiesen. Epidemiologische, biochemische und genetische Untersuchungen zeigen, daß diese Viren entweder horizontal oder vertikal (von den Eltern auf die Nachkommen) verbreitet werden.
Hybridisierungsexperimente zwischen Zell-DNA und einsträn-

gigen ^{3}H-cDNA-Transkripten, die in vitro mit Hilfe von Reverse Transkriptase und der Virus-RNA als Matrize hergestellt wurden, ergaben, daß die DNA uninfizierter, normaler Zellen bei vielen Säugern Genabschnitte enthält, die zu manchen Retroviren homolog sind. Die genetische Information solcher endogener Retroviren kann in Form von DNA mit 5-15 ähnlichen, aber nicht identischen Kopien pro haploidem Genom in die Chromosomen aller Körperzellen und der Keimzellen der Wirtsart integriert sein (BENVENISTE und TODARO 1974). Sie scheint ein normaler Bestandteil der Zellen zu sein und ihre Replikation steht unter der Kontrolle des Wirtsgenoms. Da die spezifischen Antigene endogener Retroviren auch während der Entwicklung des Organismus ausgebildet werden können, glaubt man, daß die Viren an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind (HUEBNER und TODARO 1969). Dabei, oder durch mutagene Einflüsse können sie aus der Kontrolle des Wirtsgenoms befreit werden und Partikel ausbilden. Bei Menschen fanden KALTER et al. (1973) in Plazentageweben diese C-Typ-ähnlichen Viren. Bei Hühnern (RAV_{O}), Nagern, Katzen (RD 114), Hausschweinen und Pavianen (BaEV) wurden sie, spontan oder induziert, vor allem aus sogenannten "virusfreien" Zellkulturen erhalten (LIVINGSTON und TODARO 1973, TODARO 1972; LIEBER und TODARO 1973; BENVENISTE et al. 1974). Solche Partikel können andere Zellen infizieren, aber die Zellen homologer Wirte werden nicht transformiert.
Diesen endogenen Viren stehen die exogenen Retroviren gegenüber, zu denen in den Keimzellen und in uninfizierten Zellen der Wirtsart keine oder wenige homologe Sequenzen gefunden wurden. Sie verursachen bei einer Infektion Myeloblastome (AMV), Sarkome (ASV, MSV, FSV, SiSV), oder Leukämie (MuLV, FeLV, GaLV), die besonders bei Hühnern, Nagern, Katzen und Affen untersucht werden. Sie können als Provirus in das Genom infizierter Zellen integriert werden (vergl. Abschnitt 1.3.4.2.). TODARO (1976) nimmt an, daß aus endogenen Retroviren Varianten entstanden sind, die sich an andere Tierarten anpassen konnten, sich dort weiterveränderten und als exogene oder endogene Viren im Regulationsgefüge des heterologen Genoms zu Störungen führen, welche die Transformation

und Tumorbildung zur Folge haben. Für die interspezifische Übertragung und die genetische Abwandlung der Viren führt er interessante Hinweise, vor allem auf Grund von Hybridisierungsexperimenten an. Demnach soll ein endogenes Virus des Pavians homologe Sequenzen zu Altweltaffen, zum Menschen und anderen C-Typ Viren von Primaten aufweisen, aber nicht zu anderen Säugern. Eine Ausnahme bilden dabei die Hauskatze und drei eng verwandte Arten, die ähnliche, jedoch nicht identische Sequenzen besitzen. Andererseits hybridisieren DNA-Transkripte des endogenen Rabdomyosarkomvirus (RD 114) der Hauskatze mit Zell-DNA von Altweltaffen und des Menschen, aber nicht mit DNA aus vielen anderen Katzen und Säugern. Auf Grund der bekannten stammesgeschichtlichen Aufspaltung bei Primaten und Katzen schätzt TODARO, daß vor 3-10 Millionen Jahren ein endogenes Primatenvirus auf einen Vorfahren der Hauskatze übertragen worden sein könnte und dauerhaft in das neue Wirtsgenom integriert wurde.
Entsprechende Hinweise gibt es dafür, daß Sequenzen des exogenen FeLV, die im Genom der Hauskatze und ihrer engen Verwandten integriert gefunden wurden, nicht mit dem endogenen RD 114, sondern mit einem endogenen Virus bei Ratten Verwandt sind (BENVENISTE et al. 1975). Weitere endogene Viren scheinen dauerhaft von Mäusen auf Schweine und von Mäusen auf Paviane (BaEV) übertragen worden zu sein.
Bei den exogenen Viren der Primaten (GaLV, SiSV) läßt sich dagegen keine Verwandtschaft zu Sequenzen der Maus nachweisen. Sie könnten sich allerdings trotzdem von einem endogenen Virus der Maus herleiten, da Viren, die nicht ins Genom eines Organismus integriert sind, sondern horizontal zwischen den Affenarten übertragen werden, eine unabhängigere und schnellere Abwandlung der genetischen Information erfahren können (BENVENISTE und TODARO 1975; LIEBER et al. 1975).

Die Tatsache, daß endogene Viren weit verbreitet bei vielen Säugern vorkommen, hat zu der Annahme geführt sie könnten für normale Zellen eine vorteilhafte Funktion ausüben: Wirte endogener Viren, könnten dadurch einen Selektionsvorteil erlangen, daß sie eine größere Widerstandskraft gegen

die Infektion durch andere, vielleicht noch gefährlichere Viren, besitzen. So sind Katzenarten wie die Hauskatze, welche die Gene von C-Typ Viren der Primaten im Erbgut besitzen, resistent gegen endogene Viren aus Pavianen, während andere Katzenarten infiziert werden (TODARO 1976). Wie einige Autoren berichten,können die endogenen virusspezifischen Antigene auch durch Infektion der Zellen mit exogenen Viren induziert werden. So werden befallene Zellen vielleicht durch das Immunsystem besser erkannt und bekämpft (TODARO 1972; LIEBER und TODARO 1973; RAPP et al. 1975). Da die Partikel der Retroviren manchmal auch Genabschnitte ihres Wirts enthalten, und diese bei der Infektion anderer Tierarten in deren Erbgut miteinbauen können, ist es auch möglich, daß sie eine Übermittlerfunktion für vorteilhafte Genabschnitte zwischen den Arten ausüben (SCOLNICK et al. 1973; WEISS et al. 1973). Der Vorteil der besseren und schnelleren Anpassungsmöglichkeit der Arten im Rahmen des Evolutionsgeschehens wurde dann den Verlust einiger Individuen durch Tumore überwiegen.

1.4. RETROVIREN UND MENSCHLICHE ONKOGENESE

Der Nachweis, daß C-Typ Viren in menschlichen Leukämiezellen vorhanden sind (HTLV = Human cutaneous T-Lymphom Virus, POIESZ et al. 1980), läßt vermuten,daß Retroviren auch an der Onkogenese beim Menschen beteiligt sind. Indirekte Hinweise darauf wurden durch die Entdeckung und Charakterisierung der verschiedenen makromolekularen Viruskomponenten in menschlichen Tumorgeweben erbracht. Als virusspezifische Marker können die Hüllantigene (gp52-71, p30), die 70 S RNA und die Reverse Transkriptase betrachtet werden.

Molekularbiologische Untersuchungen wurden 1971 von SCHLOM und SPIEGELMAN mit einem simultanen Testverfahren entwickelt. Es erfaßt durch eine Dichtegradientenzentrifugation des Tumorhomogenats und eine anschließende endogene Reaktion gleichzeitig die Dichte vorhandener Partikel, die Anwesenheit von

RT-Aktivität und von 70 S RNA. Dazu wird in vitro in den weitgehend kern- und zell-RNA-freien Zentrifugenfraktionen in Gegenwart von Actinomycin D (zur Hemmung der DNA-abhängigen DNA-Synthese) und mit markierten Deoxyribonukleotiden durch RT-Aktivität eine ^{3}H-DNA gebildet, deren virusspezifische Dichte bzw. Sedimentationsgeschwindigkeit anschließend durch CsCl-Gradientenzentrifugation bzw. Saccharosegradientenzentrifugation nachgewiesen werden können.

Gleichzeitig wurde die 1961 von HALL und SPIEGELMAN angewendete Hybridisierungstechnik auf das Retrovirus-Problem beim Menschen übertragen. Dazu wurde mit Hilfe von viraler RT und dem RNA-Genom aus verschiedenen Viren ^{3}H-cDNA hergestellt und als Nachweismittel im Hybridisierungstest bei menschlichen Tumoren verwendet. Nachdem sie mit den gereinigten cytoplasmatischen RNA-Fraktionen unter bestimmten Bedingungen inkubiert wurde , kann die Bildung von ^{3}H-cDNA-RNA-Komplexen, welche die virushomologen Sequenzen anzeigen, durch Zentrifugation im Cs_2SO_4-Dichtegradienten, oder durch S_1-Nuklease-Verdauung, oder durch Hydroxylapatit-Chromatographie nachgewiesen werden. SARKAR (1980) macht in diesem Zusammenhang darauf aufmerksam, daß der von verschiedenen Autoren gefundene Hybridisationsgrad von der verwendeten Methoden abzuhängen scheint. Außerdem würden die zur Hybridisierung synthetisierten ^{3}H-cDNA-Proben wahrscheinlich nur 150-250 Nukleotide vom 5'-Ende der Virus-RNA repräsentieren, so daß schon ein hoher Homologiegrad gemessen würde, wenn z.B. nur 60 Nukleotide der Zell-RNA ein Hybrid mit der ^{3}H-cDNA bildeten.

Vielfältige immunologische Methoden wurden benutzt, um in menschlichen Tumoren größere Strukturproteine, z.B. aus der inneren Virushülle nachzuweisen, oder um in Serum virusspezifische Antikörper zu suchen. Dabei lassen sich im Wesentlichen drei Gruppen von Verfahren unterscheiden:

a) Suche nach Virusantigenen in Gewebe oder Zellen. Das Material wird mit Aceton fixiert und dann mit fluoreszierenden Antikörpern, die gegen bekannte onkogene Retroviren

gerichtet sind, untersucht.

b) Suche nach Virusantigenen in rohen Zellextakten bzw. nach teilweiser oder sehr weitgehender Reinigung. Durch Antigene, die z.B. dem Virusprotein p30 ähneln, erhält man bei dem am häufigsten verwendeten Radioimmuntest (RIA) mit radioaktiv markierten p30-Antigenen aus Retroviren eine Kompetition um die Bindung an die p30-spezifischen Antikörper. Diese Methode ist noch empfindlicher als die Immunofluoreszenztechnik.

c) Präzipitation von Immunoglobulinen des Serums mit radioaktiv markierten Virusproteinen.

Der Nachweis von RT ist mit Hinsicht auf die virale Ätiologie von Tumoren von großer Bedeutung, weil man nicht nur ihre serologische Spezifität untersuchen kann, sondern weil mit Hilfe dieses Enzyms das Virusgenom in andere Formen umgewandelt werden kann, welche vielleicht erst die transformierenden genetischen Aktivitäten entfalten.

1.4.1. HINWEISE AUF B-TYP VIREN

Im menschlicher Milch entdeckten MOORE et al. (1969) MuMTV-ähnliche Partikel. Jedoch wurden im Tumorgewebe später nur selten B-Typ-ähnliche Partikel gefunden, und zwar genauso häufig in gutartigen wie in bösartigen Tumoren (THOMSSEN et al. 1973). Es wird angenommen, daß verschiedene Sorten B-Typ und C-Typ-ähnlicher Partikel bei der elektronenmikroskopischen Präparation des Gewebes entstehen können, indem sich Membranbruchstücke und andere Zelltrümmer so umgestalten, daß sie den intrazellulären, unreifen Retroviren ähnlich sehen (SARKAR und MOORE 1972; CHOPRA et al. 1973; MOORE 1974).

SCHLOM et al. (1972, 1973) konnten mit dem simultanen Nachweisverfahren in menschlicher Milch Partikel nachweisen, die eine Dichte von 1,16-1,19 g/ml im Saccharosegradienten besitzen. Sie enthielten sowohl RT-Aktivität als auch einsträngige RNA von 60-70 S und einer Molmasse von etwa 1×10^7. Aus-

serdem waren Poly A-Sequenzen von gleicher Länge wie bei Retroviren vorhanden.

Bei Gewebeproben aus malignen Tumoren verlief der simultane Nachweistest in 79% der untersuchten Fälle positiv, während er bei allen Kontrolluntersuchungen mit normalen Geweben oder gutartigen Tumoren negativ war (AXEL et al. 1972a). Entsprechende Ergebnisse (53%) erzielten GERARD et al. (1975) mit einem Test auf RT-Aktivität unter Verwendung eines enzymspezifischen Matrizen-Primers. Der simultane Nachweistest kann aber auch sowohl bei Frauen mit oder ohne Tumor positiv verlaufen, wenn gar keine virusähnlichen Partikel nachweisbar sind (ROY-BURMAN 1973).

Beim Hybridisierungstest erhielten AXEL et al. (1972b und c) bei 19 von 29 Mammatumoren einen hohen Grad an homologen RNA-Sequenzen mit ^{3}H-cDNA von MuMTV, nicht jedoch mit ^{3}H-cDNA von anderen Viren (RLV und AMV). Außerdem ließen sich in der RNA-Fraktion aus gutartigen Mammatumoren und normalen Geweben keine solchen homologen Sequenzen nachweisen. VAIDYA et al. (1974) stellten unter strengeren Bedingungen bei 5 von 17 RNA-Extrakten aus Tumoren hohe Hybridisationsraten fest und schätzten daß 1,5 bis 8 MuMTV-RNA-Kopien pro Zelle verhanden sein könnten. MPV-homologe Sequenzen konnten diese Autoren jedoch nicht finden. Dagegen haben COLCHER et al. (1974) in 7 von 10 Tumorproben das Vorhandensein solcher Sequenzen festgestellt.

Hemmstoffe, welche die Infektiosität von MuMTV bei Mäusen neutralisieren können, fanden HOLMAN (1973) im Serum von 30% und MOORE (1974) bei 25% aller Frauen. Durch Inkubation von Viren in menschlicher Milch konnte gezeigt werden, daß darin Enzyme oder Hemmstoffe enthalten sind, welche zur Veränderungen der Gestalt und der Membrandurchlässigkeit bei MuMTV führen und die Infektiosität von MuMTV sowie MuLV herabsetzen und die RT aus MuMTV, MuLV und AMV stark hemmen (SARKAR et al. 1973; SCHLOM et al. 1972; FIELDSTEEL 1974; MC CORMICK et al. 1974). Diese Hemmstoffe wurden aber nicht

genauer charakterisiert, so daß nicht bekannt ist, ob es sich um Antikörper handelt und wogegen sie gerichtet sind. WITKIN et al. (1979) nutzten die virolytische Wirkung von Anti-MuMTV-Serum und zeigten, daß durch das Serum von 13 von 65 Brustkrebspatientinnen aus MuMTV-Partikeln RT-Aktivität freigesetzt wird; dagegen nur bei 2 von 63 Patienten mit gutartigen Mammatumoren und nur bei 5 von 60 gesunden Frauen. Bei der Suche nach MuMTV wurden Antigene, welche dem gp52-Hüllprotein ähnelten im Serum bei 10 von 36 Mammatumorpatientinnen mit der Immundiffusionsmethode nachgewiesen und mit Immunoxidase-Markierung gelang der Nachweis im Tumorgewebe von 51 von 131 Patientinnen, während bei keiner der 35 benigne erkrankten oder 137 gesunden Frauen solche Antigene gefunden wurden (MÜLLER und GROSSMANN 1972; MESA-TEJADA et al. 1978).

In einem Labor wurde bisher auch die RT aus Mammatumoren isoliert und als das Enzym eines B-Typ-Virus charakterisiert (OHNO und SPIEGELMAN 1977) (vergl. Abschnitt 1.5.3.).

Eine Korrelation zwischen diesen Untersuchungen und elektronenmikroskopischen Beobachtungen oder familiär gehäuftem Brustkrebs oder eine Übertragung von Viren durch das Stillen konnten bis heute noch nicht nachgewiesen werden (SARKAR und MOORE 1972).

Einige dieser Ergebnisse lassen vermuten, daß die Infektionshäufigkeit viel höher als die Tumorbildung sein könnte. Während beim Mammatumor der Maus der Virusfaktor im Vordergrund steht, könnten beim Menschen, entsprechend wie beim Burkittlymphom, andere Faktoren starken Einfluß auf die Entwicklung der Krankheit nehmen, wie die genetische Prädisposition, die physiologische und immunologische Konstitution der Frauen, Hormone, Ernährungsgewohnheiten oder Kontakt mit chemischen Karzinogenen. Dabei können solche Einflüsse als Initiatoren und andere als Beschleuniger (Promotoren) der Transformation wirken (SARKAR 1980).

1.4.2. HINWEISE AUF C-TYP VIREN

Im Lymphknotengewebe eines an akuter lymphatischer Leukämie erkrankten Mädchens fanden DMOCHOWSKI und GREY (1957) eine beachtliche Zahl von elektronenmikroskopisch sichtbaren C-Typ Partikeln. Sie konnten aber damals nicht mit anderen Methoden untersucht werden. POIESZ et al. (1980) wiesen C-Typ Partikel in frischen peripheren Lymphozyten eines Patienten (T-Zell Lymphom) nach. Sie konnten daraus auch zwei Zellinien gewinnen, die nach der zweiten bzw. 56. Passage ständig Viren produzierten (HTLV), die sogar als "budding particles" beobachtet wurden. Sie enthielten alle Komponenten der Retroviren und ihre RT zeigte keine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen RT aus GaLV, SiSV, RD 114, Mo-MuLV und AMV.
Solche Viren, die aus frischen Biopsien von Tumorgeweben freigesetzt werden, konnten bis heute nur sehr selten beobachtet werden. Dies könnte daran liegen, daß nur sehr wenige Zellen (schätzungsweise 1 von 500) Partikel ausbilden. Vielleicht befindet sich das Genom vorhandener Viren in einem für die Replikation defektem Zustand (SEMAN und SEMAN 1968; GARDNER et al. 1977).

In Zellkulturen aus Tumoren wurden intrazelluläre Viruskomponenten dagegen schon häufiger nachgewiesen und bei Zellen von malignen Erkrankungen des Blutbildungssystems konnten nach einigen Passagen in vitro sogar öfters cytoplasmatische Partikel beobachtet werden. Sie waren allerdings unreif und konnten die anderen Zellen der Kultur nicht infizieren. Sie konnten deshalb meistens nicht ausreichend vermehrt und mit anderen Methoden charakterisiert werden. Sie waren auch nicht in der Lage andere menschliche Zelltypen in vitro zu transformieren, oder bei nicht menschlichen Primaten ähnliche Tumore zu induzieren (KOTLER et al. 1973; MAK et al. 1974; VOSIKA et al. 1975; WEIMANN et al. 1975; KLUCIS et al. 1976; SAWADA et al. 1977).
C-Typ ähnliche Viren, die von Tumorzellinien ans Medium abgegeben wurden, konnten auch von GABELMAN et al. (1975); NOOTER

et al. (1975); PANEM et al. (1975); sowie von GALLAGHER und GALLO (1975) teilweise oder genauer charakterisiert werden. Diese Partikel infizierten und transformierten homologe Zellen, aber nicht sekundäre Wirtszellen. Einige konnten auch in Zellinien aus verschiedenen Tieren weiterkultiviert werden. Dazu gehört die Entdeckung von GALLAGHER et al. (1975), die mehrmals periphere Lymphozyten aus einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) in Kultur nahmen. Nach einer gewissen Zeit unter den Kulturbedingungen konnten sie aus der Zellinie einen C-Typ Virus (HL-23) isolieren und diese spontan freigesetzten Partikel mit Erfolg auf eine andere Zellinie aus menschlichem Rhabdosarkom übertragen und anschließend biochemisch und immunologisch charakterisieren. Die Aktivität der Viren aus der Originalkultur wurde durch Antiserum gegen RT aus SiSV um 60% gehemmt. Außerdem war die RT des unbekannten Virus mit den RT von SiSV und BaLV, zwei Primatenviren, immunologisch verwandt (TEICH et al. 1975; GALLAGHER und GALLO 1975). Mit dem simultanen Nachweisverfahren wurde gezeigt, daß die Partikel im Medium der Kultur 70 S RNA und RT enthalten, während das Hybridisierungsverfahren ergab, daß sie genetische Information von zwei Viren, nämlich von SiSV und BV-M7, einem endogenen Virus des Pavians, enthalten (CHAN et al. 1976).
Es wurde die Frage diskutiert, ob es sich bei einigen dieser Entdeckungen um Laborkontaminationen handeln könne, die von Experimenten mit Primatenviren herrühren; andererseits könnten interessante stammesgeschichtliche Beziehungen zwischen den Krebsviren des Menschen und der Primaten bestehen.

Mit dem simultanen Nachweistest endeckten BAXT et al. (1972) in Zellen aus Patienten mit chronischer und akuter Leukämie eine tumorspezifische und virusähnliche RNA, von der wenigstens ein Teil als 70 S RNA zusammen mit RT an Partikel von 1,16 bis 1,19 g/ml Dichte gebunden war. Bei Leukozyten aus nicht leukämischen Patienten verlief der Nachweis dagegen negativ.
1972 zeigten HEHLMANN et al. mit Hilfe der Hybridisierungstechnik, daß in menschlichen Leukämiezellen bei Sarkomen und

Lymphomen RNA-Sequenzen vorkommen, die weitgehend mit denen von MuLV homolog sind, der ähnliche Krankheitsbilder bei Mäusen erzeugt. Dagegen zeigte sich keine Verwandtschaft mit den Sequenzen von AMV, RSV und MuMTV.

Bei den Ergebnissen, die mit immunologischen Verfahren gewonnen wurden, bestehen bis heute noch Unklarheiten, die zum Teil auch mit den verwendeten Methoden zusammenhängen. STRAND und AUGUST (1974) konnten in rohen Zellextrakten interspezies-spezifische Antigene nachweisen, die beim Radioimmuntest eine Kompetition mit den markierten p30-Proteinen aus den Retroviren RD 114 und SiSV ergaben, und zwar unabhängig davon ob die Proben aus Tumorgeweben oder aus normalen Geweben stammten. SHERR und TODARO (1974) untersuchten Rohextrakte aus 33 menschlichen Tumoren und fanden bei einem Lymphom und bei einem Ovarialtumor Antigene, die mit p30 aus BV-M7 verwandt waren, während die übrigen 31 Nachweise negativ verliefen. Die gleichen Autoren (1975) erhielten bei teilweise gereinigten Extrakten aus peripheren Leukozyten von 5 Leukämiepatienten eine positive Reaktion mit p30-Antigen aus SiSV. Bei diesen Experimenten wurden allerdings keine Angaben über die Anwesenheit von proteolytischen Enzymen gemacht. Falls Proteasen in den Zellextrakten enthalten sind, könnten sie die markierten p30-Antigene abbauen und so beim Kompetitionstest eine Kreuzreaktion vortäuschen.
Im Gegensatz dazu haben STEPHENSON und AARONSON (1976), CHARMAN et al. (1976) und auch GARDNER et al. (1977) die Proteine mit dem Molekulargewicht von 30.000 aus normalen und neoplastischen menschlichen Geweben in weit mehr als 100 Fällen sehr weitgehend gereinigt. Anschließend konnte mit dem Radioimmuntest keine interspezies-spezifische Kompetition mehr nachgewiesen werden, während in Kontrollexperimenten die viralen p30-Proteine ihre Antigen-Eigenschaften bewahrt hatten.

Auch bei den Nachweisen von virusspezifischen Serumantikörpern wurden widersprüchliche Resultate erhalten. AOKI et al. (1976), KURTH et al. (1977) und SNYDER et al. (1976) berichten von

Antikörpern, die bei einem Radioimmuntest mit markierten viralen Proteinen ausgefällt werden konnten. Andererseits waren CHARMAN et al. (1974 und 1975), STEPHENSON und AARONSON (1976), sowie GARDNER et al. (1977) bei hunderten von menschlichen Serumproben nicht in der Lage mit den Strukturproteinen der Viren von Primaten und von Mäusen eine Präzipitation nachzuweisen.

Die Reinigung und Charakterisierung C-Typ-ähnlicher RT aus verschiedenen menschlichen Tumorgeweben wurde bereits von mehreren Laboratorien durchgeführt (vergl. Abschnitt 1.5.3.).

1.5. EIGENSCHAFTEN DER RETROVIRALEN REVERSE TRANSKRIPTASEN

1.5.1. BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER VIRALEN ENZYME

Die Reverse Transkriptase (RT) ist ein für die Retroviren kennzeichnendes Enzym, das als Marker gelten kann. Sie läßt sich deutlich von den anderen Proteinen der Viren unterscheiden. Ihre Enzymaktivität wird durch Antikörper gegen die gruppenspezifischen Antigene nicht gehemmt und fehlt bei gereinigten Hüllproteinen von RSV (AARONSON et al. 1971; DUESBERG et al. 1971).
Die RT erfüllt während der Transkription des Virusgenoms zwei gut unterscheidbare Funktionen (vergl. Abschnitt 1.3.4.2.): Sie wirkt als DNA-Polymerase und als RNase.

1.5.1.1. DIE DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT

Sie unterteilt sich in zwei Enzymwirkungen, die man nicht voneinander trennen kann. Sie gehen vielleicht vom gleichen aktiven Zentrum des Polypeptids aus, weil die Kinetiken der thermischen Inaktivierung sehr ähnlich verlaufen (VERMA et. al. 1974a). Die eine, die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität, transkribiert partiell einsträngige 70 S RNA, die aus

dem Core der Virionen stammt, in komplementäre DNA. Die andere Enzymwirkung besteht in der DNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität, welche zu dem (-)DNA-Strang den (+)DNA-Strang ergänzt.

Damit die Synthese der viralen DNA beginnen kann, müssen alle vier Desoxyribonukleotidtriphosphate vorhanden sein. Sie ist RNA-abhängig und empfindlich gegen Ribonukleasen, Ribonuklease H und Actinomycin D. Bei der endogenen Reaktion dient die in einem Zellextrakt enthaltene 70 S RNA als Matrize. Daran ist eine zelluläre 4 S tRNA beteiligt, die als Starter (Primer) wirkt. Der Nukleotideinbau erfolgt am 3'-OH-Ende des Primers in 5'-Richtung der Matrize. Außerdem benötigt die volle Entwicklung der Enzymaktivität ein nichtionisches Detergens (zur Spaltung der Virus-Hülle), zweiwertige Metallionen, sowie ein reduzierendes Agens, wie z.B. Dithiotreitol (DTT). Die Temperatur für die optimale Polymeraseaktivität beträgt bei den Säugerviren 37-40 ^{o}C und bei den Vogelviren 40-45 ^{o}C. Diese endogene Reaktion wird als ein aussagekräftiger biologischer Nachweis für die Anwesenheit des Virusgenoms betrachtet (BALTIMORE 1970; TEMIN und MIZUTANI 1970; GREEN et al. 1970; SPIEGELMAN et al. 1970; COFFIN und TEMIN 1971; FARAS et al. 1972; FAN und BALTIMORE 1973; KORNBERG 1974; RYMO et al. 1974; JACQUET et al. 1974; BOLLUM 1975).

Die RT der Retroviren sind aber auch in der Lage Matrize-Primer-Komplexe zu transkribieren, die von außen einem Reaktionsgemisch zugesetzt werden (exogene Reaktion). Verwendet man gereinigte, nicht-homologe 70 S RNA, so arbeiten die Enzyme der Vogelviren im allgemeinen schneller als die der Säugerviren (LEIS und HURWITZ 1972; ABRELL und GALLO 1973; WANG und DUESBERG 1973; ABRELL et al. 1975; VERMA 1975 ; LEIS 1976). Sie kopieren unterschiedliche Bereiche der 70 S RNA, aber die Effektivität ist bei allen Systemen so gering, daß nur 3% des Genoms transkribiert werden (FARAS et al. (1972). Besonders ineffektiv verläuft die Reaktion der RT

aus MuMTV mit dem AMV-Genom (MARCUS et al. 1976) und bei den Enzymen von HaLV (Leukämie des Hamsters), sowie REV (Reticuloendotheliosisvirus) konnte die in vitro Transkription endogener oder exogener 70 S RNA gar nicht nachgewiesen werden (VERMA et al. 1974b; KIERAS und FARAS 1975). Die Transkription der heterogenen Basensequenz exogener, viraler RNA gilt als das beste biochemische Kriterium, um RT-Aktivität nachzuweisen. Die Effektivität kann dabei noch erhöht werden, wenn dem Reaktionsgemisch ein besonders wirksamer, synthetischer Primer, wie das Nukleotid-Oligomer $(dT)_{15}$ zugesetzt wird (DUESBERG et al. 1971).
Einige RT können in vitro auch viele andere natürliche RNA-Sorten kopieren, wie z.B. mRNA verschiedenen Ursprungs für Globine. Ihre Affinität zu diesen Matrizen ist im allgemeinen zwar sehr gering, die Transkription wird aber durch Primer-Oligomere erheblich gesteigert (VERMA et al. 1972; KACIAN et al. 1972; ROSS et al. 1972; CHEN et al. 1973; BERNS et al. 1973).

Die RT können in vitro auch synthetische Polyribonukleotide und Polydesoxyribonukleotide als exogene Templates verwenden. Homopolymere werden dabei im allgemeinem besser transkribiert als Heteropolymere; ihre Effektivität ist aber nicht bei allen Viren gleich (GOODMAN und SPIEGELMAN 1971; BALTIMORE und SMOLER 1971; TEMIN und BALTIMORE 1972). Die wirksamsten Homopolymer-Templates sind Poly(A), Poly(C) und Poly(dC), während die Affinität der RT für Poly(dA) nur sehr schwach ist. Als komplementäre Primer zu diesen Templates werden die Desoxyribonukleotid-Oligomere $Oligo(dT)_{12}$ und $Oligo(dG)_{15-18}$ verwendet (vergl. Tabelle 1). Die Transkription dieser synthetischen Matrizen durch Gewebehomogenate bzw. Zellextrakte stellt keinen grundlegenden Nachweis für die Anwesenheit von RT dar, denn die zellulären DNA-Polymerasen β und γ transkribieren $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ und $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ ebenfalls gut (SPADARI und WEISSBACH 1974). Sie verwenden jedoch auch $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$ als Template-Primer, so daß die Unterscheidung von den viralen Enzymen erleichtert wird (ROBERT et al. 1972; WELLS et al. 1972; WU und CETTA 1975;

TABELLE 1: ZUSAMMENSTELLUNG DER WICHTIGSTEN EIGENSCHAFTEN VON GEREINIGTEN REVERSE TRANSKRIPTASEN AUS EXTRAZELLULÄREN VIRIONEN

Virustyp	Wirtsart		Bevorzugte Matrize	Bevorzugtes Kation	Molekulargewicht	Literaturangabe
C	Vögel:	AMV, RSV	$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$	$Mg^{++} \gg Mn^{++}$	160.000 (Dimer)	GRANDGENETT et al. 1973 KACIAN et al. 1971
C	Mäuse:	RLV	$(rA)_n \cdot (dT)_{12}$	$Mn^{++} \gg Mg^{++}$	70-80.000	VAN MUIJEN u. WARNAAR 1980
		MoLV			80.000	VERMA 1975
		FLV			84.000	MÖLLING 1974b
B		MuMTV	$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$	$Mg^{++} > Mn^{++}$	108.000 (Dimer?)	MARCUS et al. 1976 DION u. MOORE 1972
C	Hamster:	HaLV	$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$		120.000 (Dimer)	VERMA et al. 1974b
C	Katzen:	RD 114	$(rA)_n \cdot (dT)_{12}$	$Mn^{++} \gg Mg^{++}$	70-80.000	GERWIN et al. 1975
		FeLV			72.000	VAN MUIJEN u. WARNAAR 1980 RHO und GALLO 1980
C	Primaten:	BaEV	$(rA)_n \cdot (dT)_{12}$	$Mn^{++} \gg Mg^{++}$	68.000	SARIN et al. 1977
		GaLV			68.000	SARIN und GALLO 1976
		SiSV			80.000	VAN MUIJEN u. WARNAAR 1980
D		MPV	$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$	$Mg^{++} > Mn^{++}$	80.000	COLCHER und SCHLOM 1980

ROBERT-GUROFF et al. 1977). Außerdem wurde ein weiterer synthetischer Template-Primer beschrieben, der nur von den viralen Enzymen transkribiert wird und deshalb den differentiellen Aktivitätsnachweis in Rohextrakten ermöglicht, nämlich $(2'\text{-O-methyl-C})_n.(dG)_{12-18}$ (GERARD et al. 1974; GERARD 1975).
In der Tabelle 1 sind die synthetischen Matrizen-Primer angegeben, die nach der Literatur bei den beschriebenen RT besonders effektiv sind. Die Enzyme aus den Vogelviren vom C-Typ , aus Mammatumorviren der Maus vom B-Typ, sowie das Primatenvirus von D-Typ bevorzugen die synthetische Matrize $(rC)_n.(dG)_{12-18}$. Dagegen wird $(rA)_n.(dT)_{12}$ von den RT aus den C-Typ Viren der Mäuseleukämie, der Katzen und der Primaten besser abgelesen.

Die Anwesenheit monovalenter Kationen, wie Na^+ oder K^+ in den Reaktionssystemen bewirkt unterhalb von 100 mM nur einen geringen, stimulierenden Effekt. Bei hohen Konzentrationen wird die virale DNA-Polymeraseaktivität gehemmt. Dagegen müssen bivalente Kationen, wie Mg^{++} oder Mn^{++} vorhanden sein und in der Tabelle 1 sind die viralen Enzymen bevorzugten Ionen zugeordnet. Daraus geht hervor, daß die Ionenabhängigkeit streng mit der Art der bevorzugten Matrize korreliert ist, d.h. die RT der Vogelviren, des MuMTV und des MPV verlangen Mg^{++}-Ionen und die Polymerasen der Mäuseleukämieviren, der Katzenviren und der C-Typ-Primatenviren sind mit Mn^{++}-Ionen effektiver. Auch diese beiden Parameter kann man bei einem biochemischen Vergleich von neuen, unbekannten RT mit bereits charakterisierten Enzymen verwenden (VERMA 1977; SARNGADHARAN et al. 1978).

1.5.1.2. DIE RNASE-AKTIVITÄT

Die RNase H wurde in vielen Retroviren aus Vögeln, Katzen, Mäusen und in den Primatenviren der Brustdrüse entdeckt. Diese Enzymaktivität ist in der Lage bei einem RNA-DNA-Hybriddoppelstrang die RNA-Kette abzubauen (MÖLLING et al.

1971; KELLER und CROUCH 1972; GRANDGENETT et al. 1972; BALTIMORE und SMOLER 1972; MÖLLING 1974a; MARCUS et al. 1974; DION et al. 1977; RHO und GALLO 1980) (vergl. Abschnitt 1.3.4.2.).
Biochemische und immunologische Untersuchungen ergaben, daß diese Enzymfunktion mit der viralen DNA-Polymerase assoziiert ist und sich auf dem gleichen Molekül, aber an anderer Stelle befindet (KELLER und CROUCH 1973; WATSON et al. 1973; LEIS et al. 1973; VERMA et al. 1974a; BREWER und WELLS 1974; MASON et al. 1974; TRONICK et al. 1975; LAI und VERMA 1978; RHO und GALLO 1980). Bei zwei temperatursensitiven Mutanten von RSV, die Defekte im ersten Teil des Replikationszyklus aufweisen, ergaben thermische Inaktivierungsexperimente bei 44 ^{o}C eine geringere Temperaturempfindlichkeit für RNase H-Aktivität als für die Polymeraseaktivität. Zugabe von NaF zum Reaktionsgemisch bewirkt eine selektive Hemmung der RNase H bis zu 80%, wenn die Inhibitorkonzentration 30 mM beträgt und 150 mM KCl zugegen sind; die Polymeraseaktivität wird jedoch dadurch kaum beeinflußt. Die Polymeraseaktivität aus FeLV wird beim Abbau des Enzyms durch Chymotrypsinogen 8-10 mal schneller inaktiviert als die RNase H. Die bei der Spaltung freigesetzte, neue RNase-Aktivität ist weiterhin durch Antikörper gegen die virale RT hemmbar.

Bei den Vogelviren, wo die beiden Enzymaktivitäten auch entdeckt wurden, wurden sie im Core der Virionen lokalisiert, während bei den Mäuseleukämieviren Unklarheiten bestehen. WU et al. (1974a) isolierten die RT aus dem Core und fanden dabei jedoch keine RNase-Aktivität, so daß man annehmen kann, sie befände sich in einem anderen Teil des Virions. GERARD und GRANDGENETT (1975) fanden zwei RNase H-Aktivitäten: eine assoziiert mit der DNA-Polymerase und eine andere unabhängig davon. Andere Autoren wie MÖLLING (1974a) konnten die Verhältnisse der Vogelviren bei FLV und MPV bestätigen.
Diese Unklarheiten könnten entstanden sein, weil die RNase H-Aktivität in den Säugerviren viel geringer ist als bei den Vogelviren und weil sie überhaupt leicht nachläßt. Deshalb ist sie sehr schwer zu charakterisieren (GRANDGENETT et al.

1972; LEIS et al. 1973; VERMA et al. 1974b; WU et al. 1974a; GREEN et al. 1974; MÖLLING 1974b; WEIMANN et al. 1974).

1.5.2. STRUKTURELLE MERKMALE DER VIRALEN ENZYME

Aus den Experimenten von KACIAN et al. (1971) zur Molekulargewichtsbestimmung geht hervor, daß jedes Viruspartikel etwa 10 RT-Moleküle zu enthalten scheint, d.h., daß nur 1% der Proteine des Virions aus RT bestehen. Die Untersuchung des Molekulargewichts und der molekularen Struktur sind aber z.B. auch für die genaue Identifizierung, für die Beurteilung des biochemischen Verhaltens im Zusammenhang mit der Molekülkonstituttion, sowie für die Aufklärung der stammesgeschichtlichen Herkunft dieses Enzymproteins von Bedeutung.
Die viralen RT besitzen, je nach der Virusklasse aus der sie stammen, eine unterschiedliche molekulare Struktur (vergl. Tabelle 1). Bei den Vogelviren wird sie aus einem Dimer ($\alpha\beta$) mit einem apparenten Molekulargewicht von 160.000 gebildet (KACIAN et al. 1971; KELLER und CROUCH 1972; GRANDGENETT et al. 1973). Bei der SDS-Gelelektrophorese spaltete sich diese gereinigte RT im äquimolaren Verhältnis in zwei Untereinheiten α und β auf, die ein Molekulargewicht von 65.000 (α) und 95.000 (β) besaßen. Bei der Isolation mit der Phosphocellulosechromatographie waren zwei aktive Formen erhalten worden: der Komplex des Holoenzyms $\alpha\beta$ und die kleinere Untereinheit α. Eine aktive Form von β wurde nicht isoliert und man nimmt an, daß ihre Enzymaktivität vielleicht bei der Reinigung verloren gegangen ist, denn in anderen Untersuchungen fand man bei beiden Untereinheiten sowohl DNA-Polymeraseaktivität als auch RNase H-Aktivität (BALTIMORE und SMOLER 1972; LEIS et al. 1973; WATSON et al. 1973). GIBSON und VERMA (1974) gelang es die beiden Untereinheiten bei den Systemen von AMV und RSV durch zweidimensionale Chromatographie der Spaltpeptide einer Trypsinverdauung zu kartieren und große Ähnlichkeiten in den Primärstrukturen nachzuweisen. Sie nahmen an, daß die Untereinheit α entsteht, wenn die β-Untereinheit in kleinere Polypeptide zerfällt.

Dagegen transkribiert die β-Untereinheit nach MÖLLING (1974a) natürliche RNA sehr effektiv und scheint die Bindungseigenschaften des Dimers an das Template zu verbessern. Außerdem könnte sie am Mechanismus der Regulation von RNase H-Aktivität mitwirken (WU und GALLO 1975).

Die RT der Mäuseleukämieviren scheinen eine monomere Struktur zu besitzen und das Molekulargewicht reicht von 70.000 bis 84.000 (ABRELL und GALLO 1973; MODAK und MARCUS 1977; VERMA 1975; KOPCHICK et al. 1978). Bei R-MuLV fanden VAN MUIJEN und WARNAAR (1980) mit der SDS-Gelelektrophorese drei Polypeptide in ungleichem Molmengenverhältnis: eines mit Molekulargewicht 80.000 (64%), welches auch die Enzymaktivität enthielt, ein zweites kleineres mit 67.000 (28%) und ein drittes von 32.000 (8%). Die anschließende Peptidkartierung ergab, daß die ersten beiden Proteine strukturverwandt sind und daß das Zweite ein Spaltprodukt des Ersten darstellt. Dagegen war die dritte Komponente (32.000) mit den anderen beiden nicht verwandt, sondern es war eine Verunreinigung durch das Hüllprotein p30.
Entsprechende Resultate liegen auch bei Mo-MuLV und FLV vor, wo zwei kleinere Polypeptide mit den Molekulargewichten von 68.000 und 60.000 als Spaltprodukte eines größeren Proteins (82.000) identifiziert wurden (MÖLLING 1974b; GERARD und GRANDGENETT 1975; VERMA 1975; PEEBLES et al. 1976).

Beim Hamster erhielten VERMA et al. (1974b) für die RT aus HaLV ein Molekulargewicht von 120.000, bestehend aus zwei Untereinheiten von 68.000 und 53.000.
Bei MuMTV wurde das Molekulargewicht des nativen Enzyms mit der Sedimentationsgeschwindigkeit zu 108.000 bestimmt. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden aus der gereinigten RT dagegen zwei Polypeptide von 85.000 und 50.000 erhalten. Demnach könnte des Enzym aus Untereinheiten bestehen, es wurde aber noch nicht genau untersucht, ob das aktive Enzym eine homopolymere oder heteropolymere Zusammensetzung hat (MARCUS et al. 1976).
Für die Molekülmasse der RT aus MPV von Primaten liegen erst

zwei widersprüchliche Angaben vor: ABRELL und GALLO (1973) fanden 110.000 mit der Saccharosegradientenzentrifugation und COLCHER und SCHLOM (1980) fanden 80.000 mit der SDS-Gelelektrophorese.

Für die RT der anderen Säugerviren wurde wie bei den Mäuseleukämieviren eine monomere Struktur mit einem Molekulargewicht zwischen 68.000 und 80.000 gefunden. Es wurde darüber spekuliert, daß diese Virusenzyme den α-Untereinheiten der RT bei den Vogelviren entsprechen könnten, und daß die β-Untereinheiten bei den Säugerviren (falls sie wirklich existieren) hochgradig instabil sind, oder so leicht von den α-Untereinheiten abzuspalten sind, daß sie schon bei der Reinigung verloren gegangen sind (MÖLLING 1974a; MONDAL et al. 1975; GERWIN et al. 1975).

Die aus den Zellen gereinigten RT scheinen andere Molekulargewichte aufzuweisen, als die direkt aus den Viruspartikeln isolierten. Für das Enzym des Virus RD 114 wurden ca. 70.000-80.000 bestimmt (vergl. Tabelle 1), während GERWIN et al. (1975) für das intrazellulär gefundene 95.000 angeben. Es wurde angenommen, die schwere Form könnte ein zellulärer Prekursor der leichteren Form sein, die dann in die Viruspartikel gepackt wird. Die leichten Formen ließen sich jedenfalls nicht durch Aggregations- bzw. Dissoziationsvorgänge bei Behandlung mit verschiedenen Salz- und Detergentienkonzentrationen in einander umwandeln. Dies gelang dagegen bei der RT aus GaLV-infizierten Zellen. Sie hat ein Molekulargewicht von 130.000 und geht bei hohen Salz- und Detergentienkonzentrationen reversibel in die aus GaLV-Partikeln isolierte Form von 70.000 über (MONDAL et al. 1975).

Bei den Untersuchungen zum immunologischen Verhalten der RT zeigte es sich, daß keine gemeinsamen Antigeneigenschaften bestehen:

a) zwischen den viralen RT und den zellulären DNA-Polymerasen (α, β, γ und mitochondriale),
b) zwischen den RT, die aus Wirtstieren verschiedener syste-

matischer Klassen isoliert wurden, also z.B. zwischen C-Typ Viren der Vögel und der Säuger,

c) zwischen RT der B-, C- und D-Typ Viren,

d) zwischen den RT aus endogenen und exogenen Viren, obwohl diese Viren vom gleichen Typ sein und bei der gleichen Wirtsart vorkommen können. So sind z.B. BaEV nicht mit SiSV/GaLV und RD 114 nicht mit FeLV immunologisch verwandt.

Wenn in dieser Weise also eine hohe Spezifität zwischen einem bekannten Antigen und entsprechenden Antikörpern vorliegt, dann muß die neutralisierende Wirkung bei einem homologen Enzym gut feststellbar und aussagekräftig sein. So wurde bereits festgestellt, daß die RT aus Mo-MuLV mit FeLV, die aus SiSV mit GaLV und die aus Mo-MuLV sowie aus RD 114 mit BaEV strukturelle Verwandschaft aufweisen müssen (AARONSON et al. 1971; SCOLNICK et al. 1972; PARKS et al. 1972; LONG et al. 1973; SHERR et al. 1974).

1.5.3. NACHWEIS RETROVIRALER REVERSE TRANSKRIPTASEN AUS MENSCHLICHEN TUMOREN

Seit der Entdeckung der viralen RT in den siebziger Jahren sind immer wieder Arbeiten über die Identifizierung solcher Enzyme in menschlichen Tumorgeweben erscheinen. GALLO et al. (1970) isolierten das Enzym aus Leukozyten von drei Patienten mit akuter Leukämie und zeigten, daß es in normalen weissen Blutzellen fehlt. MAK et al. (1974) isolierten es aus Knochenmarkszellen von Patienten mit Leukämie im Remissionsstadium und die Arbeitgruppe von CHANDRA aus myelofibrotischer Milz, aus Melanom, aus Osteosarkom und aus menschlicher Plazenta (CHANDRA und STEEL 1977; CHANDRA et al. 1978; EBENER et al. 1979; WELTE et al. 1979; VOGEL und CHANDRA 1981).

Die Ergebnisse guter Charakterisierungen von gereinigten RT aus weiteren Tumorarten des Menschen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Aus den im Abschnitt 1.5.2. genannten Gründen, gilt es als eine der aussagekräftigsten Möglichkeiten, die

TABELLE 2: ZUSAMMENSTELLUNG DER WICHTIGSTEN EIGENSCHAFTEN VON GEREINIGTEN REVERSE TRANSKRIPTASEN AUS MENSCHLICHEN TUMORGEWEBEN

Herkunft	Bevorzugtes Kation	Molekular-gewicht	Immunologische Beziehung	Hinweis auf Virus-Typ	Literaturangabe
Pleurazellen, Lymphom	Mn^{++}	N.U.	MuLV	C	PRIORI et al. 1971
Leukozyten, AML	Mn^{++}	140.000 (70.000)	SiSV/GaLV	C	MONDAL et al. 1975 GALLAGHER et al. 1974
Milz, CLL	Mg^{++}	70.000	N.U.	C	WITKIN et al. 1975
Knochenmarkszellen, ALL	N.U.	N.U.	SiSV	C	NOOTER et al. 1975
Milz, Myelofibrose	Mn^{++}	70.000	SiSV	C	CHANDRA u. STEEL 1977
Leuzocyten, CLL	Mn^{++}	70.000	keine	C	GALLAGHER 1977
Lymphomzellen	Mn^{++}	72-78.000	SiSV	C	KAPLAN et al. 1977 GOODENOW u. KAPLAN 1979
Melanom	Mn^{++}	68.000	BaEV/RD 114	C	CHANDRA et al. 1978
Osteosarkom	Mn^{++}	68.000	BaEV/RD 114	C	EBENER et al. 1979 WELTE et al. 1979
Mammatumor	Mg^{++}	70.000	MPV	D	OHNO et al. 1977 OHNO u. SPIEGELMAN 1977
T-Zellen, Lymphom	Mg^{++}	95.000	keine	?	RHO et al. 1981 POIESZ et al. 1980
Plazenta	Mg^{++} Mn^{++}	70.000 98.000	MF		VOGEL und CHANDRA 1981

N.U. = nicht untersucht

Virusverwandschaft einer im menschlichen Krebsgewebe gefundenen RT nachzuweisen, wenn ihre Aktivität durch einen oder mehrere Antikörper teilweise gehemmt wird, die gegen gereinigte RT aus bekannten Viren verschiedener Tierarten erzeugt wurden. Gemeinsame Antigeneigenschaften weisen auf homologe Strukturen zu bekannten viralen Enzymen hin und erlauben möglicherweise sogar die Zuordnug zu einer bestimmten Virusgruppe. Man erkennt, daß die von OHNO et al. (1977) und OHNO und SPIEGELMAN (1977) charakterisierte RT aus Brustkrebsgewebe immunologisch mit MPV verwandt ist. Diese Aktivität wurde durch Mg^{++}-Ionen stärker stimuliert als durch Mn^{++}-Ionen, so wie es auch von den Enzymen aus MuMTV und MPV bekannt ist. Dagegen sind alle andere RT, die Mn^{++}-Ionen bevorzugen, immunologisch mit den DNA-Polymerasen der C-Typ Viren verwandt. Zwei andere Mg^{++}-abhängige Enzyme wurden nicht immunologisch untersucht bzw. sie konnten keiner Virusgruppe zugeordnet werden (WITKIN et al. 1975; POIESZ et al. 1980; RHO et al. 1981).

2. AUFGABENSTELLUNG

Die Identifizierung von Virusbestandteilen der DNA-Viren und Retroviren in Tumorgeweben des Menschen führte zu der Annahme, daß diese Viren an der Tumorgenese beteiligt sind. Die Retroviren stehen auch deshalb unter dem Verdacht Krebs beim Menschen zu erzeugen, weil sie bei Tieren für eine Reihe entsprechender Tumorarten verantwortlich sind.
Zum Nachweis von Retroviren in menschlichen Geweben sind mehrere Methoden geeignet, mit denen bereits sehr eindrucksvolle Hinweise auf die Virusäthiologie vieler Tumoren erbracht wurden. Die Korrelation zwischen dem gemeinsamen Auftreten von malignen Tumoren und der Viruskomponenten konnte jedoch bis heute noch nicht lückenlos hergestellt werden, da diese Nachweise noch nicht bei allen Tumorarten gelungen sind. Dies hat verschiedene Ursachen, die in der Einleitung angesprochen wurden und die teilweise auf die benutzten Untersuchungsmethoden zurückzuführen sind, die aber teilweise auch prinzipieller Natur sind, d.h. mit dem Zustand und der Aktivität der Viren im Gewebe zusammenhängen können. Nur in einem Tumor konnten bisher eindeutig infektiöse Viruspartikel nachgewiesen werden (POIESZ et al. 1980). Deshalb ist es auch weiterhin notwendig in Tumoren nach Retroviren zu suchen und die Viruskomponenten mit immer feineren Methoden nachzuweisen.

Die Entdeckung der Reverse Transkriptase als retroviralem Marker eröffnete eine neue Möglichkeit die Anwesenheit von Retroviren indirekt nachzuweisen. Bisher ist dies schon bei verschiedenen Tumoren gelungen (vergl. Tabelle 2).
Die Absicht in menschlichen Ovarialtumoren nach Reverse Transkriptase zu suchen, begründet sich durch frühere Beobachtungen: SHERR u. TODARO (1974) fanden mit Hilfe eines Radioimmuntests im Rohextrakt aus Tumorzellen des Ovars ein Protein, das mit dem p30 Strukturprotein des endogenen Primatenvirus BaEV verwandt war. Von GERARD et al. (1978) stammt der Hinweis, daß Reverse Transkriptase in menschlichen Ovarien vorkommen könnte. Sie untersuchten 16 maligne Tumoren und 9 benigne er-

krankte bzw. gesunde Ovarien. Zentrifugenfraktionen mit der Dichte 1,14-1,20 g/ml wurden mit einem Detergenz behandelt und Phosphataseaktivität über eine Phosphocellulosesäule abgetrennt. In 8 dieser Tumorextrakte fanden sie $(rC_m)_n.(dG)_{12-18}$ transkribierende Enzymaktivität und nahmen eine aus viralen Partikeln freigesetzte Reverse Transkriptase an. Die neun Kontrollproben waren dagegen negativ. Da das Enzym mit wenigen Reinigungsschritten relativ schnell extrahiert wurde, ging wenig Aktivität verloren. Allerdings weisen die Autoren selbst auf den hohen und stark schwankenden Background dieser Messung hin, den sie in Form der endogenen Aktivität fanden und als Mittelwert aller Proben zur Korrektur berücksichtigen mußten. Die z.T. hohe endogene Aktivität stellt also einen entscheidenden Nachteil dar. Bei dem geringen Reinheitsgrad des Enzyms sind auch weitergehende biochemische Charakterisierungen nicht möglich.
So lag bislang keine Studie vor, bei der Reverse Transkriptase aus einem menschlichen Ovarialtumor weitestgehend gereinigt und auch gründlich biochemisch und serologisch untersucht wurde.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war also die Anwesenheit von Reverse Transkriptase als retroviralem Marker in Ovarialtumorgewebe des Menschen eindeutig nachzuweisen und damit einen Beitrag zu Aufklärung der Äthiologie dieser Tumorart zu leisten. Das Problem wurde im drei Abschnitte gegliedert:

1) Reinigung und Abtrennung der Reverse Transkriptase von den zellulären Nukleinsäuren und DNA-Polymerasen des Gewebes.
2) Charakterisierung des isolierten Enzyms nach biochemischen physikochemischen und serologischen Gesichtspunkten.
3) Isolierung und Charakterisierung der Reverse Transkriptase aus einem weiteren Tumorgewebe (Mammakarzinom), um die biochemischen Eigenschaften des aus Ovarialtumorgewebe isolierten Enzyms mit einer Reverse Transkriptase vergleichen zu können, die nach einer bisher vorliegenden Charakterisierung nicht in verwandtschaftlicher Beziehung zu den C-Typ Viren steht, sondern zum MPV (OHNO und SPIEGELMAN 1977).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. GERÄTEVERZEICHNIS

Analysenwaagen (Mettler)
Automatische Pipetten (Eppendorf)
Büchner Trichter
Dispensette für Flaschenaufsatz (Brand)
Elektrofokusierungsäule, 8100-1 (ml 110) (LKB)
Exsikkatoren
Filtrationsgeräte (Millipore)
Fraktionssammler (LKB 2070 Ultro Rac II)
Gefriertruhe (Revco, Ultralow -80 ^{o}C)
Glas-Chromatographiesäulen: 1,6x50 cm, 1,6x30 cm, 1x20 cm (Pharmacia)
Gradientenmischgeräte, GM-1 (Pharmacia)
Hand-Homogenisator, 60 ml Kapazität (Fischer)
Kältebad mit Thermostat (Colora)
Kühlzentrifuge (Sorvall, Superspeed RC 2) Rotor SS-34
Kurzzeitmesser (Kienzle)
Leitfähigkeitmesser, Type CDM 3 (Radiometer)
Liquid-Szintillationsspektrometer (Searle GmbH, Nuclear Chicago, ISOCAP/300 und Mark III
LKB 2210 Potentiometric Recorder
LKB Uvicord S-UV Monitor für LC und HPLC
LKB 8121 Ampholine Gradient Mixer
Magnetrührer (IKA-Combimag red)
Macrosolute Concentrators (Amicon)
Mikropipetten (Adjustable Micropettor, SMI)
Netzgerät 250 V/250 mA Power Supply (Desaga)
PAG-Elektrophoresis System HAVANA (Desaga)
Ph-Meter (Orion Research, Modell 601 A)
Präzisionswaagen (Mettler)
Präzisionswaage für Zentrifugengläser
Quick Scan Densitometer (Desaga)
Radioaktivitätsstandards (Beckman)
Schlauchpumpe, PLG-Vierfach (Desaga)
Schüttelgerät Reax (Hèidolph)

Separating Unit Screening Electrophoresis System HAVANA (Desaga)
Spektrometer (Zeiss, PMQ II und Jasco, Uvidec-1)
Stoppuhr (Kienzle)
Temperierbares Inkubationsbad (Haake)
Thermometer
Trockenschrank (Heraeus)
Ultrazentrifuge, Präparative (Damon IEC/B-60) Rotor 404
Waring-Blendor, 1 Liter Kapazität mit Kühlmantel (Braun)

3.2. MATERIALVERZEICHNIS

Ampholine Trägerampholyten pH 5-7 und pH 3,5-10 (LKB)
Aktive Sepharose 4 B (Pharmacia)
Carboxymethyl CM-Sephadex C-50 (Pharmacia)
Diäthylaminoäthyl DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia)
Diäthylaminoäthyl-Cellulose DEAE, Faserform, Servacel DEAE 23 SH (Serva)
Diäthylaminoäthyl-Cellulose DEAE, Mikrogranular, DEAE 52 (Whatman)
Dialysierschlauch-Visking, Type 20/32, Ø 16 mm (Serva)
Electrophoresis Calibration Kit für LMW Proteins (Pharmacia)
Eppendorf-Reaktionsgefäße 3810 (Eppendorf)
Filterpapier für Büchner-Trichter (Schleicher, Schüll)
Glasfaserfilter, GF/C, 25 Ø (Whatman)
Indikatorpapier
Nylonstrumpf
Parafilm
Phosphocellulose-P-Ionenaustauscher, Kapazität P-11 (Whatman)
Szintillationsfläschchen (Zinsser)
Sephadex G-15 und 25 Medium (Pharmacia)
Toluol-Szintillator für nichtwäßrige Proben, Quickzint 501 (Zinsser)
Ultrogel, AcA 44 für Gelfiltration 10.000-130.000 (LKB)

3.3. CHEMIKALIENVERZEICHNIS

Acrylamid 4 x krist., p.a. (Serva)
Äthynol, 95% (Merck)
Äthanolamin (Merck)
Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA), (Serva)
Albumin aus Rinderserum (Serva)
Ammoniumpersulphat, p.a. (Serva)
Chloroform (Merck)
Desoxyadenosin-5´-triphosphat (dATP), Dinatriumsalz (Boheringer)
Desoxycytidin-5´-triphosphat (dCTP), Tetranatriumsalz (Boehringer)
Desoxyguanosin-5´-triphosphat (dGTP), Tetranatriumsalz (Boehringer)
Desoxythymidin-5´-triphosphat (dTTP), Tetranatriumsalz (Boehringer)
2´-Desoxyguanosin-^{3}H-methyl-5´-triphosphat (^{3}H-dGTP), Tetranatriumsalz (Amersham Buchler)
Desoxythymidin-^{3}H-methyl-5´-triphosphat (^{3}H-dTTP), Trinatriumsalz (Amersham Buchler)
Diphenylamin (Merck)
Dithiothreitol (DTT) (Biomol)
Dodecylsulphat, Na-Salz (SDS), (Serva)
D (+)-Saccharose, reinst (Merck)
Eisen (III)-Chlorid (Merck)
Essigsäure, 99% (Merck)
Glyzin (Merck)
Glyzerin, $C_3H_8O_3$, doppelt destilliert, ca. 87% p.a. (Merck)
Kaliumchlorid, p.a. (Merck)
Kaliumnatriumtartrat, krist. (Merck)
m-Kresol p.a. (Merck)
Kupfer (II)-Sulfat (Merck)
Magnesiumchlorid (Merck)
Mangan (II)-Chlorid (Merck)
Methanol (Merck)
Natriumazid (Merck)
Natriumcarbonat, wasserfrei (Merck)
Natriumchlorid (Merck)

Natriumhydrogencarbonat (Merck)
Natriumlauge (Merck)
Natriumpyrophosphat p.a. (Merck)
N´N´-Methylenbisacrylamid, reinst (Serva)
N,N,N´,N´-Tetramethyläthylendiamin (TMED) (Serva)
Oligodesoxyguanidylsäure $(dG)_{12-18}$ (Biochemicals)
Oligodesoxythymidylsäure $(dT)_{12-18}$ (Biochemicals)
Orcin, krist. (Merck)
Phenol p.a. (Merck)
Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteus (Merck)
Poly (2´-O-Methylcytidyl).Oligo Desoxyguanidylsäure, $Poly(rC_m).(dG)_{12-18}$ (Boehringer)
Polyadenyl-dodecathymidylsäure, $Poly(rA).(dT)_{12}$ (Boehringer)
Polydesoxyadenylsäure, Poly(dA) (Boehringer)
Polydesoxyadenyl-decadesoxythymidylsäure, $Poly(dA).(dT)_{10}$ (Boehringer)
Polycytidyl-oligodesoxyguanidylsäure, $Poly(rC).(dG)_{12-18}$ (Boehringer)
Pronase (Worhington)
Rinderpankreas-Desoxyribonuklease I (Boehringer)
Salzsäure, konz. (Merck)
Schwefelsäure, reinst (Merck)
Serva Blau R (Serva)
Trichloressigsäure, krist. p.a. (Merck)
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris) p.a. (Merck)
Triton X-100 (Serva)

3.4. NACHWEISMETHODEN UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN

3.4.1. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON RIBONUKEINSÄURE (nach CHANDRA und APPEL 1973,S. 53)

In Gegenwart von Eisenchlorid und Salzsäure wird RNA gespalten und die Ribose zu Furfural dehydriert und mit Orcin zu einem grünen Farbstoff kondensiert. Die Reaktion tritt nicht quantitativ ein und ist auch nicht spezifisch. Andere Zucker und DNA können den Nachweis stören.

Lösung 1 Eisenchloridlösung:

100 mg Eisen (III)-Chlorid
in 100 ml konz. Salzsäure

Lösung 2 Orcinlösung:

6% (g/v) Orcin in 96% Äthanol

Lösung 3 Reagenzlösung:

100 ml Lösung 1 + 3,5 ml Lösung 2
Das Gemisch soll erst kurz vor der Verwendung hergestellt werden.

Lösung 4 RNA-Standard:

Stammlösung 0,5 mg/ml

Durchführung:
1,5 ml Standardlösung bzw. 1,5 ml Probenlösung werden mit 3 ml Lösung 3 gemischt und für 20 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach dem Abkühlen kann man die Extinktion des Farbstoffs bei 665 nm in einer 1 cm Küvette mit dem Spektralfotometer messen. Als Kontrolle diente Pufferlösung anstatt RNA-Lösung. Die Konzentration der RNA in einer Probe wird dann aufgrund der spektralfotometrischen Messung folgendermaßen berechnet:

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu g/ml) = \frac{E_x - E_o}{E_{st} - E_o} \cdot C_{st} \cdot V$$

wobei: E_x = Extinktion des Probeansatzes
E_o = Extinktion des Kontrollansatzes
E_{st} = Extinktion des Standardansatzes
C_{st} = Konzentration der Standardlösung
V = Verdünnungsfaktor

Falls kein Standardwert mitgeführt wird oder der Wert der Probe stark von dem des Standards abweicht, kann die Konzentration auch aus der Eichkurve abgelesen werden (Abb. 3).

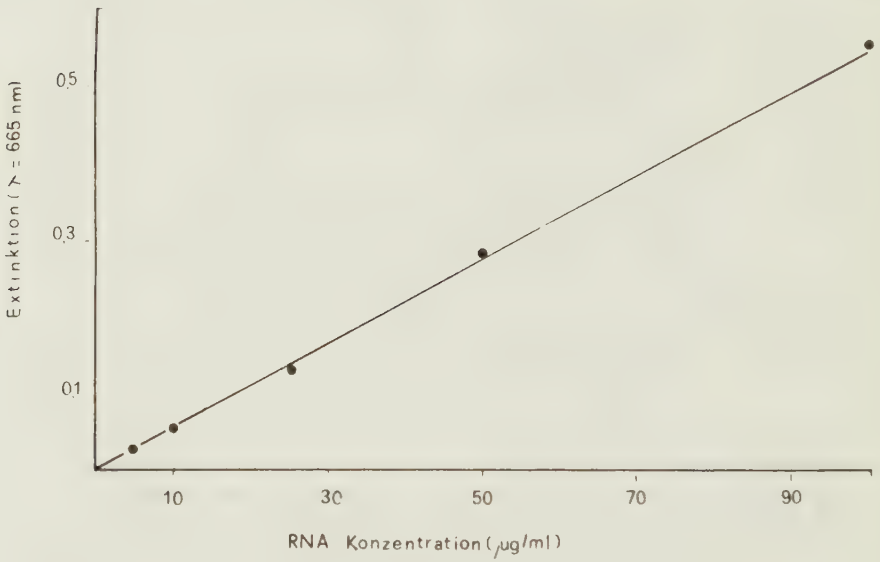


ABBILDUNG 3: EICHKURVE ZUR RNA-BESTIMMUNG MIT DER ORCINREAKTION

3.4.2. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON DESOXYRIBONUKLEINSÄURE (nach CHANDRA und APPEL 1973, S. 52)

DNA reagiert mit Diphenylamin in Gegenwart von Essigsäure und Schwefelsäure unter Bildung eines blauen Farbstoffes (BURTON 1956).

Lösung 5: Diphenylaminlösung:

1 g Diphenylamin wird in 100 ml Eisessig gelöst und mit 2,75 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Im Kühlschrank 4 Wochen haltbar.

Lösung 6: DNA-Standard:

Stammlösung 1 mg/ml

Durchführung:
1 ml Probelösung und 2 ml Lösung 5 werden gemischt und in einem verschlossenen Reagenzglas für 10 Min. in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach dem Abkühlen wird die Extinktion bei 595 nm in einer Küvette von 1 cm Dicke gemessen. Die Kontrollproben enthalten einen entsprechenden Puffer anstatt DNA-Lösung. Die Standard-Proben umfaßten den Konzentrationsbereich von 50-500 µg DNA/ml und die Extinktion war der Konzentration proportional. Die Berechnung der Konzentration erfolgt wie bei Abschnitt 3.4.1.

3.4.3. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PROTEINEN (nach LOWRY et al. 1951)

Kupferionen bilden mit Proteinen in alkalischer Lösung einen blau gefärbten Komplex (Biuret-Reaktion). Eine wesentlich intensivere Blaufärbung erhält man, wenn dieser Komplex eine Lösung reduziert, die Phosphomolybdat und Phosphowolframat enthält (Reagenz nach FOLIN-CIOCALTEUS), wobei sich Molybdän-Blau bildet. Verfälschungen der Bestimmung können durch Tris und durch Reduktionsmittel wie Merkaptane auftreten (COOPER 1981; BENSADOUN und WEINSTEIN 1976).

Lösung 7 Phenolreagenz (Folin-Ciocalteus):

Das käufliche Reagenz wird mit aqua bidest. im Verhältnis 1:2 (v/v) verdünnt (gegen Phenolphthalein soll die Säurekonzentration ca. 1 N sein).

Lösung 8 Folin-Reagenz-Lösung:

Natriumcarbonatlösung 2% (g/v):
2 g Na_2CO_3 werden in 0,1 N NaOH ad 100 ml gelöst.
Kupfersulfatlösung:
wäßrige Lösung, 1% (g/v)
Kaliumnatriumtartratlösung:
wäßrige Lösung, 2% (g/v)

Nach Herstellung dieser Lösungen mischt man 0,2 ml Kupfersulfatlösung mit 0,2 ml Kaliumnatriumtartratlösung und füllt mit Natriumcarbonatlösung auf 20 ml auf.

Lösung 9 Proteinstandard:

Die Stammlösung, bestehend aus 1 mg/ml Rinderserumalbumin, wurde entsprechend verdünnt, um die Eichkurve im Bereich von 20-200 µg Protein/ml herzustellen (Abb. 4)

Durchführung:
0,1 ml Probelösung und 0,5 ml Folinreagenz (Lösung 8) werden im Reagenzglas gut gemischt und für 10 Min. stehen gelassen. Dann werden 0,05 ml Phenolreagenz (Lösung 6) zugegeben, gemischt und noch weitere 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Extinktion wird bei 740 nm in einer Küvette von 1cm Schichtdicke bestimmt. Die Kontrollproben enthalten anstelle von 0,1 ml Protein-Probelösung 0,1 ml proteinfreie Pufferlösung. Die Berechnung der Konzentration erfolgt wie bei Abschnitt 3.4.1.

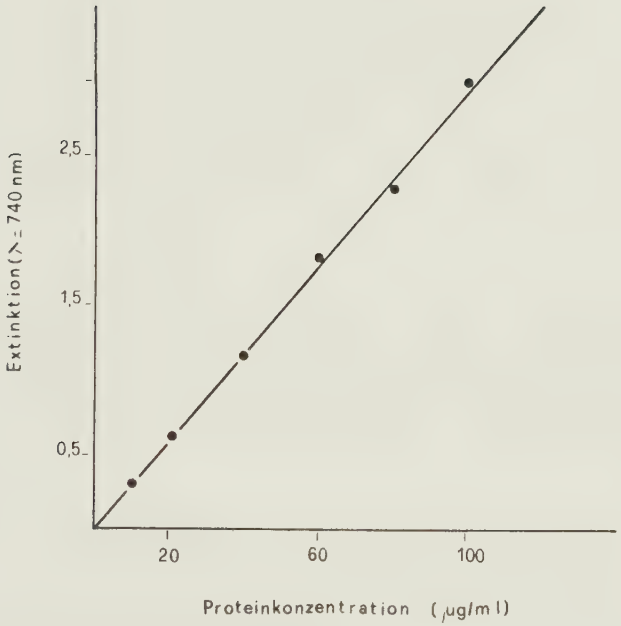


ABBILDUNG 4: EICHKURVE ZUR PROTEINBESTIMMUNG MIT DER FOLIN-REAKTION

3.4.4. BESTIMMUNG DER KCL-KONZENTRATION BEI GRADIENTEN

In verdünnter wäßriger Lösung liegt KCl praktisch vollständig dissoziiert vor. Bei konstanter Temperatur, Spannung, Elektrodenabstand und Leiterquerschnitt ist die Ionenbeweglichkeit konstant und der Widerstand der Lösung oder auch ihre Leitfähigkeit der Ionenkonzentration entsprechend. Die Leitfähigkeit G ist als der Kehrwert des Ohm'schen Widerstandes R definiert; die Einheit wird in Siemens (S) angegeben:

$$G = \frac{1}{R} \text{ (S)} \quad \text{bzw.} \quad \left(\frac{1}{\Omega} \right)$$

Die Leitfähigkeit wurde mit einem Konduktometer unter konstanten Bedingungen bei + 4 °C bestimmt. Mit Standard-KCl-Lösung wurde im Konzentrationsbereich von 10-450 mM KCl in Puffer IV und Puffer VI (Lösung 13 und 14) eine Eichkurve erstellt (Abb. 5).

3.4.5. BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN ENZYMAKTIVITÄT BEI DER DNA-SYNTHESE

Die Lösungen und die Zusammensetzungen der Reaktionsgemische zur Untersuchung auf DNA-Polymeraseaktivität sind in Abschnitt 3.8. beschrieben.
^{3}H-dGTP bzw. ^{3}H-dTTP werden mit der gleichen spezifischen Radioaktivität in die DNA-Polymere eingebaut, mit der sie in den Reaktionsansatz gegeben werden. Sie läßt sich aus der spezifischen Radioaktivität der käuflichen Lösungen berechnen, indem man die Menge an zugesetztem, nicht markiertem dGTP bzw. dTTP berücksichtigt. In den Reaktionsansätzen betrug die spezifische Radioaktivität dann für ^{3}H-dGTP 1 µCi/266,3 pMol und für ^{3}H-dTTP 1 µCi/204,6 pMol. Die Zähleffektivität bei der Radioaktivitätsmessung läßt sich erfassen, indem man Standardproben herstellt, die 1 µCi des markierten dNTP enthalten und dazu unmarkiertes dNTP im gleichen Verhältnis wie in den Reaktionsansätzen. Sie werden auf einem Glasfilter getrocknet mit 10 ml Toluolszintillatorflüssig-

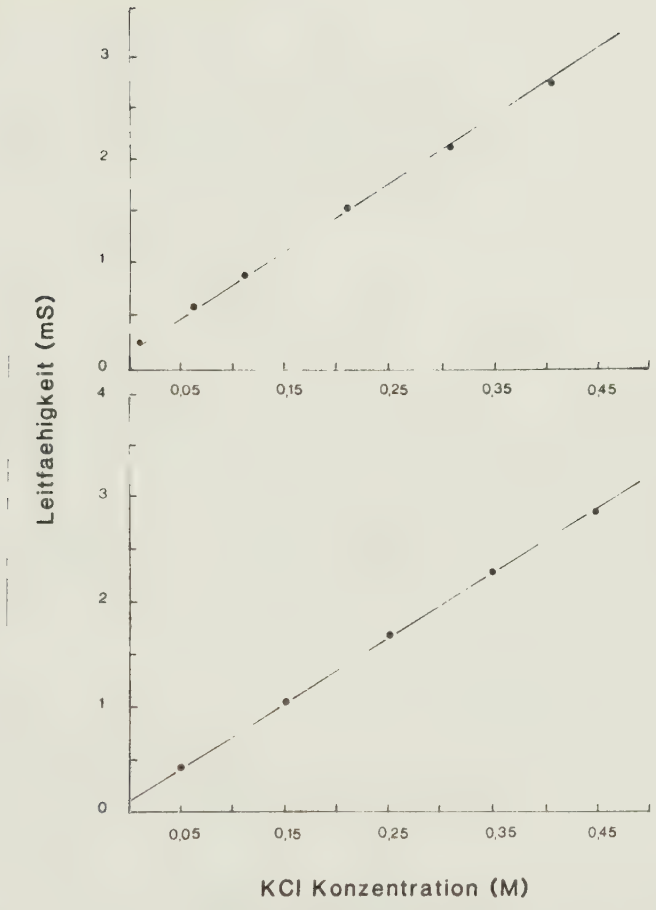


ABBILDUNG 5: EICHKURVE ZUR POTENTIOMETRISCHEN BESTIMMUNG DER KCL-KONZENTRATION
Oben: Bestimmung für Puffer VI
Unten: Bestimmung für Puffer IV

keit gemessen.
Die Kanalverhältnisse betrugen für diese Standards wie bei allen auf Glasfiltern gemessenen Proben 0,27 bis 0,35.
Eine Eichkurve mit unterschiedlich gequenchten Standards (Fa. Beckman) ergab dafür eine Ungenauigkeit der Meßeffektivität von 6%, so daß eine genauere Korrektur nicht notwendig war.
Für die in den Standards eingesetzte Radioaktivität von 1 µCi erhält man dann die gemessene Radioaktivität (IpM).

Der Quotient $\frac{\text{Gemessene Radioaktivität des Standards (IpM)}}{^{3}\text{H-dNTP + dNTP (nicht markiert) (pMol)}}$

kann dann zur Berechnung des Nukleotideinbaus in DNA benutzt werden.
Zur Vergleichbarkeit wird der Nukleotideinbau auf 1 mg Protein der enzymhaltigen Lösung bezogen und man erhält die spezifische Enzymaktivität einer Probe, die für 30 Min. Reaktionsdauer gilt:

$$\frac{\text{Nukleotideinbau (pMol)}}{\text{Proteingehalt (mg)}} =$$

$$\frac{\text{Radioakt. d. Probe (IpM) x Gesamt-dNTP im Standard (pMol)}}{\text{Radioaktivität des Standards (IpM) x Protein (mg)}}$$

3.5. REINIGUNG VIRALER 70 S RNA

Die virale 70 S RNA wurde aus AMV nach WU et al. (1974b) gereinigt:

Lösung 10 Phenol-Kresol-Lösung:

150 mg Phenol
21 mg Kresol
15 ml dest. Wasser mit 0,1% 8-Chinolinol

Diese Lösung wurde vor der Verwendung durch Ausschütteln mit Lösung 11 gereinigt und gleichzeitig mit TNE-Puffer gesättigt.

Lösung 11 TNE-Puffer pH 7:

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
100 mM NaCl

Lösung 12 Äthanol-Lösung:

67% Äthanol
0,3 M NaCl

Durchführung:
5 ml einer Virussuspension von AMV werden mit 0,5 mg nukleasefreier Pronase für 30 Min. bei 37 °C inkubiert, um die Ribonukleasen im Medium und an der äußeren Hülle der Virionen zu inaktivieren. Dann wird der Suspension SDS bis zur Endkonzentration von 1% zugesetzt und für weitere 30 Min. bei 37 °C inkubiert, damit die Viruspartikel aufbrechen. Um die Proteine abzutrennen, werden 5 ml Lösung 10 eingerührt und einige Zeit gut vermischt. Die Oberphase wird abgesaugt und noch zweimal mit Lösung 10 und dann zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Dann wird die RNA aus der wäßrigen Phase mit NaCl (Endkonzentration 0,3% M) und Äthanol (Endkonzentration 67%) bei -20 °C über Nacht ausgefällt.
Das Präzipitat wird für 15 Min. bei 13.000xg abzentrifugiert, noch zweimal mit kaltem Äthanol (Lösung 12) gewaschen, in möglichst wenig TNE-Puffer aufgenommen und dann durch Zentrifugieren für 4 Stunden bei 40.000 rpm im Schwingbecher-Rotor (40 S, IEC-Zentrifuge) über einen linearen Saccharose-Gradienten (5-40%) gereinigt und dann fraktioniert.
Die Fraktionen, welche nach ihrer UV-Absorption die Hauptmenge an RNA enthalten, werden vereinigt und die RNA erneut mit Äthanol bei -20 °C über Nacht ausgefällt. Nachdem das Präzipitat abzentrifugiert und wieder in TNE-Puffer aufgenommen wurde, zeigte das UV-Spektrum eine einzige Absorptionsbande bei 264 nm (Abb. 6).

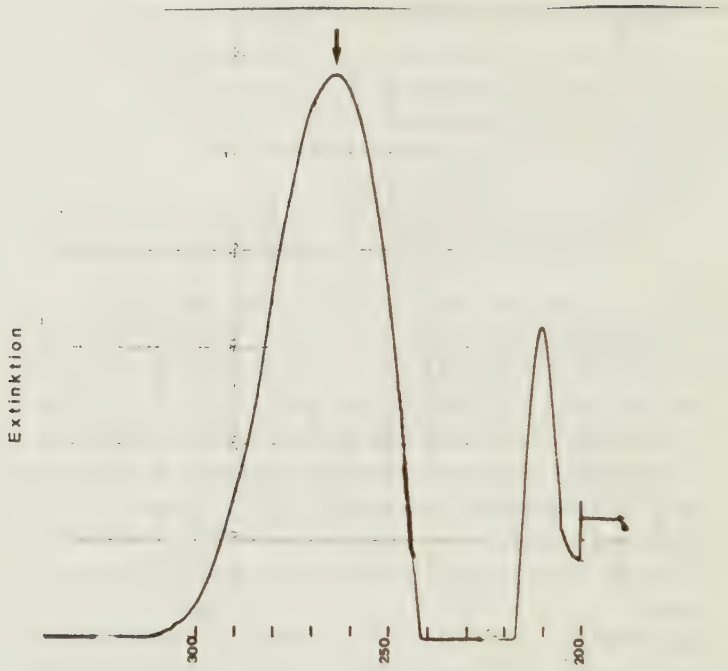


ABBILDUNG 6: UV-SPEKTRUM DER 70 S RNA -PRÄPARATION AUS AMV.
Das Extinktionsmaximum befindet sich bei 264 nm.

3.6. VORBEREITUNG DER CHROMATOGRAPHIESÄULEN

Lösung 13 Puffer IV pH 7,5:

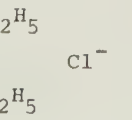
Wäßrige Lösung:
37,5 mM Tris-HCl
1 mM DTT
1 mM EDTA
50 mM KCl
10% (v/v) Glyzerin

Lösung 14 Puffer VI pH 7,9:

Wäßrige Lösung:
37,5 mM Tris-HCl
1 mM DTT
1 mM EDTA
10 mM KCl
10% (v/v) Glyzerin

3.6.1. ANIONENAUSTAUSCHER

Die verwendeten Gele auf Cellulose- oder Dextranbasis sind gut geeignet, um im Bereich zwischen pH 2 und pH 9 Proteinmoleküle zu trennen, die ein Molekulargewicht zwischen 30.000 und 200000 haben. DEAE-Sephadex A_{50} ist ein schwacher basischer Austauscher, DEAE-Cellulose DE 23 und DE 52 sind relativ starke Ionenaustauscher. Sie enthalten als funktionelle Gruppe den Diäthylaminoäthyl-Rest:



Vorbereitung von DEAE-Sephadex A_{50}

Nach PHARMACIA, Uppsala, Sweden (1978): Sephadex ion exchangers.

1 g Trockengewicht entspricht 15-20 ml nassem Bettvolumen. Das trockene Dextran wird in einem Überschuß von destilliertem Wasser suspendiert, mit 1 M Tris-Lösung auf pH 7 eingestellt und für etwa 2 Stunden zum Quellen (hydratisieren der polaren Gruppen) in ein siedendes Wasserbad gestellt. Wenn sich die Suspension abgekühlt hat, wird der Überstand abgesaugt und das Gel im Büchnertrichter mit Puffer IV (Lösung 13) äquilibriert. Wenn der pH-Wert und die Konduktivität des Filtrats dem Puffer IV entsprechen, füllt man eine Säule (1,6x23 cm) mit dem vorbereiteten Gel (Fließgeschwindigkeit 70 ml/h) und läßt das Gel-Bett noch mindestens mit 2-3 Säulenvolumen des Puffers äquilibrieren. Die Fließgeschwindigkeit beim Äquilibrieren betrug 50 bis 60 ml/h.

Vorbereitung der DEAE-Cellulose DE 23

Nach WHATMAN Lab Sales Ltd, Maidstone, England: Leaflet IL 2, advanced ion exchange celluloses information.

Dieses Gel ist vom faserartigen Typ und hat eine große Kapazität. Es kann aber große Polyanionen auch irreversibel binden, wenn die Dichte der Ladungen des Austauschers zu groß ist.

1 g trockene Cellulose wird im 15-fachen Volumen 0,5 N Salzsäure suspendiert und langsam für 30 Minuten gerührt. Dann wird der Überstand dekantiert und das Gel in einem Büchnertrichter mit zwei-fach destilliertem Wasser so lange gewaschen bis das Filtrat einen pH-Wert von 4,5 aufweist. Nun wird der Austauscher wieder in zwei-fach destilliertem Wasser suspendiert und in einem Exsikkator unter dem Vakuum einer Wasserstrahlpumpe bei leichtem Rühren entgast.

Dann wird die Cellulose im 15-fachen Volumen von 0,5 N Natronlauge suspendiert, langsam für 30 Minuten gerührt und danach der oben beschriebene Waschvorgang wiederholt bis das Filtrat den pH-Wert 8 erreicht hat. Das Gel wird mit einem Überschuß Puffer IV (Lösung 13; 15-30 ml/g Trockengewicht) äquilibriert, wobei der Puffer mehrmals gewechselt wird bis pH-Wert und Leitfähigkeit der Suspension denen des

Puffers entsprechen. Dieses vorbehandelte Gel wird mit etwa 70 ml/h in eine Säule (1,6x25 cm) gepackt und mit 2-3 Säulenvolumen des Puffers äquilibriert, wobei die Durchflußgeschwindigkeit dann etwa 60 ml/h beträgt.

Vorbereitung der DEAE-Cellulose DE 52

Nach WHATMAN Lab Sales Ltd, Maidstone, England: Leaflet IL 2, advanced ion exchange celluloses information.

Dieser Austauscher besitzt eine mikrogranulare Form, die zu der großen Bindungsfähigkeit seiner ionisierten Gruppen für geladene Makromoleküle beiträgt.
Der Austauscher wurde von der Herstellerfirma bereits im vorgequollenen Zustand geliefert. Er wird mit 15-30 ml/g Trockenmasse des Puffers VI (Lösung 14) äquilibriert und unter Rühren im Exsikkator (Wasserstrahlpumpe) entgast. Anschließend kontrolliert man noch einmal, ob pH-Wert und Konduktivität dem Startpuffer (Lösung 14) entsprechen, füllt das Gel in eine Säule (1,6x20 cm) und äquilibriert mit 2-3 Säulenvolumen des gleichen Puffers. Die Durchflußgeschwindigkeit beim Packen betrug 70 ml/h , beim Äquilibrieren der Säule dagegen nur 56 ml/h.

3.6.2. KATIONENAUSTAUSCHER

Bei den Kationenaustauschern gibt es unterschiedliche dissoziierende funktionelle Gruppen.
CM-Sephadex C_{50} besitzt Carboxymethylgruppen ($-CH_2-COOH$) und ist ein schwach saurer Austauscher mit einer großen Kapazität für neutrale und basische Proteine. Dagegen besitzt P-Cellulose Phosphatgruppen ($-O-\overset{\overset{\bar{O}}{\|}}{P}-OH$ mit OH) mit zwei Dissoziationsstufen: während bei pH 4 oder darunter nur eine Anionenladung an den funktionellen Gruppen auftritt, sind sie bei pH 8 vollständig dissoziiert. Diese bibasischen Gruppen bin-

den die protonisierten Gruppen basischer Proteine besonders stark.

Vorbereitung von CM-Sephadex C_{50}

Die Methode ist die gleiche wie bei DEAE-Sephadex A_{50} (s.o.).

Vorbereitung von P_{11}-Cellulose

Nach WHATMAN Lab Sales Ltd, Maidstone, England: Leaflet IL 3, cellulose phosphate ion exchangers.

1 g der trockenen Cellulose wird im 25-fachen Volumen 0,5 N NaOH-Lösung suspendiert und für 5 Minuten gerührt. Der Überstand wird dekantiert und das Sediment mit destilliertem Wasser in einem Büchnertrichter gewaschen bis das Filtrat einen pH-Wert unterhalb von 10 erreicht. Dann suspendiert man das Gel im 25-fachen Volumen von 0,5 HCl-Lösung, läßt es für weitere 5 Minuten rühren und wiederholt den oben beschriebenen Waschvorgang bis das Filtrat pH 3 erreicht. Daraufhin wird die Gelsuspension in einem Becherglas im Exsikkator entgast und dann im 20-fachen Volumen des 3-10-mal konzentrierten Puffer IV (Lösung 13) suspendiert und eventuell der pH-Wert korrigiert. Der Überstand wird wieder dekantiert und das Gel mit Puffer IV äquilibriert. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt bis das Filtrat den pH-Wert und die Leitfähigkeit des Startpuffers erreicht hat.
Die Säule (1,0x16 cm) wurde mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 35 ml/h gepackt, und das Gel über Nacht mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/h äquilibriert.

3.6.3. AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Zur Affinitätschromatographie bindet man solche Moleküle als Liganden kovalent an die stationäre Phase einer Gelsäule, an die sich die zu reinigende Substanz spezifisch aber re-

versibel anlagern kann. Die Selektivität der Adsorption an die Säule ist z.B. bei Komplexbindungen wie zwischen Antigen und Immunoglobulin, Enzym und Inhibitor, Repressor und Induktor oder Hormonrezeptor und Wirkstoff gegeben. Damit die Adsorption gelingt, die gebundene Substanz aber auch ohne Anwendung denaturierender Bedingungen wieder eluiert werden kann, darf ihre Affinität zu dem stationären Liganden nicht zu klein aber auch nicht zu groß sein.
Als Matrix wird meistens großporige Agarose verwendet. Um Liganden, die primäre Aminogruppen besitzen, an das Gel zu binden, läßt man zuerst Cyanbromid (Br-C≡N) mit den OH-Gruppen reagieren. Das Produkt, die "aktivierte Agarose", ist sehr instabil und kann die primären Aminogruppen des Cytosins von Polycytidylsäure anlagern. Die Verknüpfung besteht wahrscheinlich aus einer Isoharnstoffgruppe (-O-C(=NH)-NH-Cytosin-R) (COOPER 1981).

Durchführung:

Lösung 15 Natriumhydrogencarbonatpuffer pH 8,3:

0,1 M $NaHCO_3$
0,5 M NaCl

Lösung 16 1 M Äthanolamin-Puffer pH 8:

Lösung 17 Acetatpuffer pH 4:

0,1 M Essigsäure
1 M NaCl

Lyophilisierte CNBr-aktivierte Sepharose-4B kann von Pharmacia, Sweden, bezogen und nur 1 bis 2 Wochen aufbewahrt werden. Mit 20 ml 1 mM HCl je 1 g CN-Br-Sepharose wird bei Zimmertemperatur eine Suspension hergestellt. Nach 15 Minuten wird über eine feine Glasfritte abgesaugt und mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen. Man resuspendiert bei Zimmertemperatur in 100 ml Lösung 15 und saugt den Puffer nach 5 Minuten wieder

ab. Nun wird das Gel unter Eiskühlung in 5 ml Lösung 15 gegeben, die 10 mg Polycytidylsäure enthält, und 4 Stunden langsam gerührt. Dann wäscht man das Gel mit Puffer 15, bis im Filtrat photometrisch keine Polycytidylsäure mehr nachzuweisen ist, fügt Lösung 16 hinzu und rührt anschließend wieder für 4 Stunden unter Eiskühlung. Jetzt wäscht man dreimal abwechselnd erst mit 50 ml Lösung 17 und dann mit Lösung 15. Schießlich wurde das Gel mit Puffer IV (Lösung 13) äquilibriert und wie bei P_{11}-Cellulose in eine Säule gepackt.

3.6.4. GELFILTRATION

Die Gelpartikel enthalten ein Netzwerk, dessen Poren von der gleichen Größenordnung wie die zu trennenden, gelösten Teilchen sind. Da kleine Moleküle in das Innere der Gelpartikel eindringen können, werden sie, entsprechend ihrer Größe, längere Zeit dort verbringen und nicht mit dem Strom der beweglichen Phasen wandern. Größere Moleküle werden also weniger retardiert und früher eluiert.
So dient diese Methode dazu:

a) proteinhaltige Lösungen zu entsalzen oder andere niedermolekulare Substanzen abzutrennen oder
b) Proteine nach ihrer molekularen Größe zu trennen und zu fraktionieren. Dies kann zu einer Molekulargewichtsbestimmung ausgebaut werden. Zur Eichung dient das Elutionsvolumen von Marker-Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht.

Vorbereitung von Ultrogel AcA 44-LKB

Nach LKB, Bromma, Schweden: Instrument manual, ultrogel for gel filtration.

Das Gel besteht aus 4% Agarose mit 4% Polyacrylamid und die Trennwirkung erstreckt sich auf den Bereich von 10.000 bis 130.000.
Eine besondere Vorbereitung ist nicht notwendig, da das Gel im vorgequollenen Zustand geliefert wird. Man suspendiert

die Partikel in einem Überschluß des Trennpuffer (Puffer IV, Lösung 13) und läßt im Exsikkator mit einer Wasserstrahlpumpe ein gutes Vakuum einwirken, um Glasblasen zu entfernen. Dann wird das Gel mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 87 ml/h in eine Säule von 1,6x38 cm gepackt. Dann wird das Gel-Bett noch mit 75 ml/h äquilibriert. Am Schluß werden noch pH-Wert und Konduktivität kontrolliert, die mit den Werten des Trennpuffers übereinstimmen müssen.

Vorbereitung von Sephadex G_{15} oder G_{25}:

Nach PHARMACIA, Uppsala, Schweden (1978): Gel filtration in theory und practice.

1 g Trockengewicht ergibt 4-6 ml Bett-Volumen. Die Vorbereitung des Gels erfolgt wie bei DEAE-Sephadex A_{50}. Eine Säule von 2,8x30 cm wird mit einer Geschwindigkeit von 80 ml/h gepackt und noch mit 2-3 Säulenvolumen Puffer IV äquilibriert, damit sich das Gel-Bett stabilisieren kann. Dabei beträgt die Durchflußgeschwindigkeit etwa 76 ml/h.

3.7. METHODEN ZUR REINIGUNG VON REVERSE TRANSKRIPTASEN

Die Auswahl der Reinigungsschritte und ihre Alternativen werden in Abschnitt 3.7.7. diskutiert.
Alle Tumorgewebe waren bei -80 °C eingefroren und wurden vor der Verwendung bei -20 °C über Nacht aufbewahrt. Die Arbeitsschritte werden bei einer Temperatur zwischen 0 und 4 °C ausgeführt.

Durchführung:

Lösung 18 Puffer I pH 7,5

Wäßrige Lösung:
37,5 mM Tris-HCl
1 mM DTT
0,5 mM EDTA
5 mM $MgCl_2$

Lösung 19 Puffer II pH 7,5

Wäßrige Lösung:
37,5 mM Tris-HCl
1 mM DTT
0,5 mM EDTA
5 mM $MgCl_2$

Lösung 20 Puffer III pH 7,5

Wäßrige Lösung:
37,5 mM Tris-HCl
1 mM DTT
1 mM EDTA
1 M KCl
0,3% (v/v) Triton X-100
10% (v/v) Glyzerin

Lösung 21 Puffer V pH 7,5

Wäßrige Lösung:
37,5 mM Tris-HCl
1 mM DTT
1 mM EDTA
50 mM KCl
50% (v/v) Glyzerin

3.7.1. HOMOGENISATION, ZENTRIFUGATION UND GELFILTRATION

10 bis 250 g Tumorgewebe werden im 10-fachen Volumen Puffer I (Lösung 18) für 20 Minuten eingeweicht.
Dann wird in einem Messer-Homogenisator mit eiswassergekühlter Ummantelung (Waring Blendor) jeweils für 5 Minuten bei geringer, mittlerer und dann bei hoher Geschwindigkeit homogenisiert. Anschließend wird mit einem Handhomogenisator aus Glas weiterhomogenisiert und das Homogenat durch einen Nylonstrumpf filtriert.
Es folgt eine erste Zentrifugation für 30 Minuten bei 10.000xg in einer Kühlzentrifuge (Sorvall, Rotor SS-14). Das Sediment,

das Zellkerne und Mitochondrien enthält, wird verworfen und ein Milliliter des Überstandes (Fraktion I) zur Bestimmung der Proteinkonzentration, der Konzentration der Nukleinsäuren sowie der Aktivität von DNA-Polymerasen aufbewahrt (vergl. Abschnitte 3.4. und 3.8.).
Je 15 ml des Überstandes werden auf das gleiche Volumen Puffer II (Lösung 19) geschichtet (density-barrier mit 20% Saccharose) und in der Ultrazentrifuge (Damon IEC, Rotor 404) für 180 Minuten bei 170.000xg zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das mikrosomale Pellet in ca. 20 ml Puffer III (Lösung 20) suspendiert, etwa 5 Minuten mit dem Handhomogenisator homogenisiert und 60 Minuten langsam bei 4 ^{o}C gerührt.
Dann werden die ungelösten Rückstände für 20 Minuten bei 170.000xg abzentrifugiert. Der Überstand wird bei 4 ^{o}C aufbewahrt; das Pellet wird nochmals mit wenig Puffer III homogenisiert, für eine Stunde gerührt, wiederum abzentrifugiert und dann mit dem Überstand vereinigt.
Um die Salzkonzentration in dieser Suspension zu verringern, dialysiert man entweder in einem Dialyseschlauch gegen Puffer IV (Lösung 13), oder man filtriert über eine Sephadex G_{25}-Säule (Abschnitt 3.6.4.), wobei die Proteine vor den Salzen eluieren. Die Spanne zwischen der Elution der Proteine und der Salze wurde mit Dextranblau und Vitamin B_{12} (Pharmacia) bestimmt und außerdem die Konduktivität gemessen.
Das Eluat wird fraktioniert aufgefangen (Fraktionssammler LKB 2070 Ultro Rac II), seine UV-Absorption durch ein Photometer mit Durchflußküvette und Kompensationsschreiber aufgezeichnet (LKB Uvicord S-UV und LKB 2210 Potentiometric Record) und in jeder zweiten der proteinhaltigen Fraktionen die Reverse Transkriptaseaktivität bestimmt (vergl. Tabelle 3 und 5, Abschnitt 3.8.).
Die aktiven Fraktionen der Sephadex G_{25}-Filtration werden vereinigt, durch Dialyse gegen Puffer V (Lösung 21) eingeengt und anschließend für 12 Stunden gegen Puffer IV (Lösung 13) äquilibriert.
Wenn die gleiche Konduktivität (KCl-Konzentration) wie im

Dialysepuffer erreicht ist, wird 1 ml (Fraktion II) entnommen, um die Protein- und RNA-Konzentration sowie die Aktivität von DNA-Polymerasen zu bestimmen (vergl. Abschnitt 3.4. und 3.8.).

3.7.2. CHROMATOGRAPHIE MIT DEAE-CELLULOSE DE 23 ODER DEAE-SEPHADEX A_{50}

Der auf 15-20 ml eingeengte Pool der Sephadex G_{25}-Chromatographie wird zur Adsorption auf eine der Anionenaustauscher-Säulen aufgetragen, die nach Abschnitt 3.6.1. vorbereitet wurde.
Man spült die Säule mit wenigstens 2 Volumen (100 ml) Puffer IV, um die nicht oder locker gebundenen Substanzen aus dem Ionenaustauscher herauszuwaschen. Die Durchflußgeschwindigkeit während des Auftragens, des Waschens und der anschließenden Elution der Proteine betrug 26 ml/h bei der DE 23- und 10 ml/h bei A_{50}-Säule. Die DNA-Polymerasen werden mit einem Gradienten (je 100 ml 0,05 M KCl und 0,5 M KCl in Puffer IV) eluiert und in Fraktionen zu 3ml aufgefangen. Dabei und bei allen anderen Chromatographien wird die UV-Absorption gemessen. Jede zweite Fraktion wird auf Reverse Transkriptase getestet , in jeder Dritten wird die RNA-Konzentration bestimmt . Die Fraktionen der Enzymaktivität werden vereinigt und in einem Dialyseschlauch gegen Puffer V (Lösung 21) reduziert und dann zum Dialysieren für 12 Stunden in Puffer VI (Lösung 14) gelassen.
Nachdem durch Leitfähigkeitsmessung nachgeprüft ist, ob die Konzentration der K^+-Ionen mit der des Äquilibrierungspuffers übereinstimmt, wird 1 ml (Fraktion III) entnommen, um die Protein- und RNA-Konzentration sowie die Aktivität von DNA-Polymerasen zu bestimmen.

3.7.3. CHROMATOGRAPHIE MIT DEAE-CELLULOSE DE 52

Im Falle der DE 52-Chromatographie wurde die Fraktion III

auf die nach Abschnitt 3.6.1. vorbereitete Säule aufgetragen und die Säule mit 100 ml Puffer VI gespült. Die gebundenen Proteine werden mit einem linearen KCl-Gradienten (je 100 ml von 10 mM bis 500 mM KCl in Puffer VI) nacheinander, bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 26 ml/h eluiert.
Die einzelnen Fraktionen (2 ml) des Eluats werden auf Reverse Transkriptaseaktivität untersucht und die aktiven Fraktionen gepoolt. Dann wird das Volumen durch Dialyse gegen Puffer V auf 3-5 mal reduziert und dann noch etwa 12 Stunden in Puffer IV dialysiert bis die KCl-Konzentration 50 mM beträgt. Vor der weiteren Reinigung wird 1 ml (Fraktion IV) entnommen und Protein-Konzentration sowie die Aktivität von DNA-Polymerasen bestimmt.

3.7.4. CHROMATOGRAPHIE MIT PHOSPHOCELLULOSE P 11 ODER CM-SEPHADEX

Die eingeengten Poolfraktionen der Sephadex A_{50}-Chromatographie (FLV) oder der DE 52-Chromatographie (Humangewebe) werden auf die vorbereitete Phosphocellulose- oder CM-Sephadex-Säule (vergl. Abschnitt 3.6.2.) aufgetragen und anschließend mit 2 Volumen (30 ml) Puffer IV gewaschen, um die nicht fest an die funkionellen Gruppen gebundenen Proteine abzutrennen. Die gebundenen DNA-Polymerasen werden mit einem linearen KCl-Gradienten (je 30 ml von 50 mM KCl bis 1000 mM KCl in Puffer IV) eluiert und getrennt. Das Volumen der Fraktionen betrug etwa 0,6 ml.
Nachdem jede zweite Fraktion auf Reverse Transkriptase getestet ist und die aktiven Fraktionen zu Pools vereinigt sind, wird die Reduktionsdialyse in Puffer V, sowie die Ausgleichsdialyse mit Puffer IV durchgeführt.
Dann werden die Proteine der Lösung quantitativ bestimmt und mit spezifischen Methoden immunologisch, biochemisch usw. charakterisiert.

3.7.5. AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE (POLY(C)-SEPHAROSE)

Die enzymhaltige Lösung (in Puffer IV) wird auf die nach Abschnitt 3.6.3. vorbereitete Säule aufgetragen und mit 6 Säulenvolumen Puffer IV gewaschen, um die nicht spezifisch gebundenen Makromoleküle abzutrennen. Dann wird mit einem linearen Gradienten (je 90 ml 50 mM KCl und 1000 mM KCl in Puffer IV) eluiert, in Fraktionen zu 0,6 ml aufgefangen und die Enzymaktivität mit drei verschiedenen Matrizen bestimmt (vergl. Abschnitt 3.8. und Abb. 9).

3.7.6. ISOELEKTRISCHE FOKUSIERUNG IM DICHTEGRADIENTEN

Die Proteinmoleküle sind im wäßrigen Mileu kolloidal gelöst und stoßen sich durch die Überschußladungen auf ihrer Oberfläche ab und bleiben fein verteilt. Legt man an eine solche Lösung eine Spannung an, beginnen die Kolloidteilchen unter dem Einfluß des elektrischen Feldes zu wandern.
Bei der Elektrofokusierung wird der Trenneffekt nun dadurch erreicht, daß man die Proteinmoleküle in einem stabilen und linearen pH-Gradienten wandern läßt. Dieser wird dadurch erzeugt, daß man der Proteinlösung ein Gemisch ampholytischer Elektrolyte zusetzt, deren Moleküle nun ebenfalls im elektrischen Feld wandern und zwar relativ schnell wegen ihres kleinen Molekulargewichtes. Sie wandern in Richtung Kathode oder Anode wie es ihrer Nettoladung entspricht. Da wegen der elektrolytischen Reaktionen an den Elektroden der Anodenraum sauer und der Kathodenraum alkalisch bleibt, wandern sie nur so weit bis sie die Zone in der Lösung erreicht haben, in der ihre Nettoladung infolge des Wechsels des pH-Wertes gleich Null geworden ist, d.h. wo ihr IP erreicht ist. Dort reichern sie sich an und bilden nun als Puffer den pH-Gradienten in der Säule, in dem dann die Proteine ihrerseits nur bis zu dem Punkt wandern können, wo der pH-Wert ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Da ihre Nettoladung dort gleich Null ist können sie als sichtbare Bande ausfallen.
Glyzerin ist als Zusatz für diesen Gradienten gut geeignet,

weil es stabilisiert und nicht mit den Enzymproteinen reagiert.

Durchführung:
Nach LKB, Bromma, Schweden: Instrument manual LKB 8100, ampholine electrofocusing column.

Lösung 22 Dichte Kathodenlösung:

15 g Saccharose
10 ml H_2O
6 ml 1 M NaOH

Lösung 23 Leichte Anodenlösung:

1,5 ml 1 M H_3PO_4
8,5 ml H_2O

Lösung 24 Dichte Gradientenlösung:

30 ml Glyzerin
20 ml Puffer IV
1,5 ml Ampholin pH 5-7
1,5 ml Ampholin pH 3,5-10

Lösung 25 Leichte Gradientenlösung:

50 ml Puffer IV + Enzymlösung
1,5 ml Ampholin pH 3,5-10
3,0 ml Ampholin pH 5-7

Die Fokusiersäule LKB 8100-1 (Abb. 7) mit 110 ml Inhalt wird an ein Kältebad mit Umwälzpumpe von 4 °C angeschlossen. Durch den Füllstutzen (Nr. 8) führt man einen Plastikschlauch und kann mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe die Lösung 22 in den unteren Teil, wo später die Kathode geschaltet wurde, einfüllen. Es ist wichtig, daß die Elektroden (Nr. 2 und Nr. 4) mit verdünnter Lauge bzw. Säure umgeben werden, so daß sich die Ampholytmoleküle und damit die Proteinmoleküle nicht annähern können und an den Elektroden nicht oxidiert oder reduziert werden.

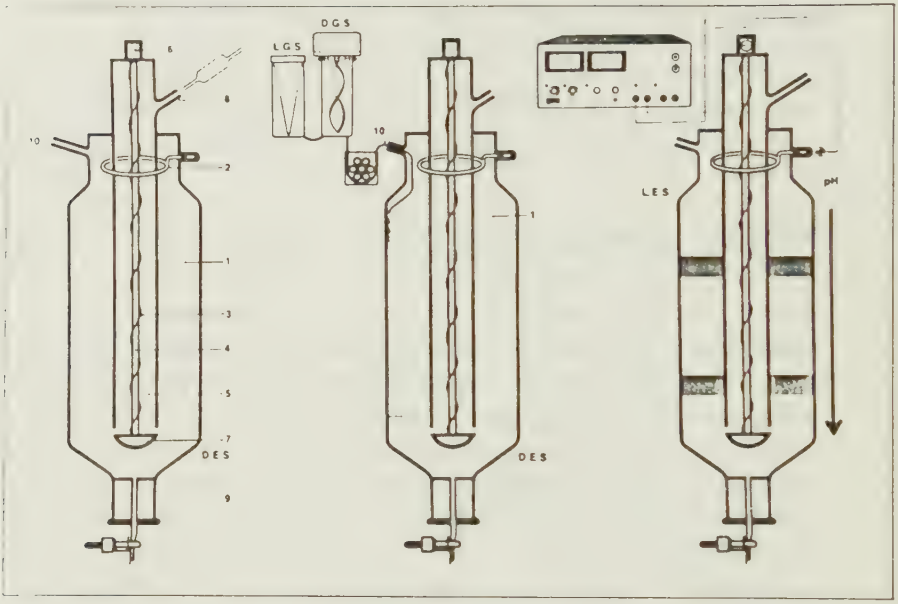


ABBILDUNG 7: AUFBAU DER SÄULE ZUR PRÄPARATIVEN ISOELEKTRISCHEN FOKUSIERUNG
(aus: Electrofocusing seminar notes- Part 3: Preparative - LKB)

Während der Vorbereitung und dem Füllen der Säule bleibt der Hahn (Nr. 7) für die innerste Elektrodenkammer geöffnet. Dann werden Lösung 24 und 25 für den Ampholin-Gradienten in den Gradientenmischer gegeben, wobei die dichtere Lösung (24) in der vorderen Kammer sich mit der Zeit immer mehr mit der weniger dichten Lösung (25) mischen kann. Die Gradientenmischung wird über den Füllstutzen Nr. 10 mit 70 ml/h eingepumpt, und die Lösung erhält so nach oben immer geringere Dichte.
Wenn die Säule fast ganz voll ist (Nr. 1) trägt man oben, wo sich die Anode befindet, die Lösung 25 auf, bis die Elektrode gut bedeckt wird.
Dann wird die Spannungsversorgung an die Elektroden angeschlossen: für die Anfangsphase betrugen die Spannung 400 V, die max. Leistung 15 W und der Strom 19 mA.
Während des Fokusiersvorgangs bleibt die Leistung konstant, dagegen sinkt die Stromstärke ab, so daß die Spannung infolgedessen ansteigt. Der Zeitbedarf bis zum Ende der Trennung hängt von der Proteinmenge ab; sie betrug 22-30 Stunden bei 200-1500 µg/ml. Wenn die Stromstärke für etwa 3 Stunden konstant bleibt, ist der minimale Wert erreicht und die Fokusierung beendet. Die Spannung betrug dann 1600 V, die max. Leistung 15 W und der Strom 4 mA. Man unterbricht die Spannungsversorgung, schließt den inneren Hahn (Nr. 7) und öffnet den Schlauch für die Entnahme der Lösung.
Anschließend kontrolliert man das Eluat mit Indikatorpapier, bis die dichte Kathodenlösung herausgekommen ist und pH 9 erreicht ist; dann wird der Gradient fraktioniert aufgefangen, wobei durch den Stutzen (Nr. 10) der Säule destilliertes Wasser nachgepumpt wird, was den hydrostatischen Druck etwa gleich hält und die Gradientenflüssigkeit herausdrückt. Die Fließgeschwindigkeit beträgt dabei etwa 60 ml/h, das Fraktionsvolumen 1,2 ml bzw. 1,5 ml.
Am Ende wird noch bei 4 ^{o}C der pH-Wert der Fraktionen gemessen und dann wird mit den Matrizen $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ und $(rA)_n.(dT)_{12}$ die Enzymaktivität bestimmt (vergl. Abschnitt 3.8.)

3.7.7. DISKUSSION DER REINIGUNGSMETHODEN

Die Reinigung einer Reverse Transkriptase wurde zuerst bei einer Zellsuspension aus FLV-infizierten Mäusen durchgeführt. Dabei konnten alle Methoden erprobt und standardisiert werden, die später bei menschlichem Tumorgewebe Anwendung fanden. Dies war notwendig, weil Reverse Transkriptasen in menschlichen Tumoren meistens nur in geringer Menge gefunden wurden (SARNGADHARAN et al. 1978). Dagegen enthalten FLV-infizierte Zellen eine wesentlich höhere Reverse Transkriptaseaktivität, die auch bis zum Ende der Reinigungsprozedur stabil bleibt.

Zur Verringerung des Salzgehaltes und zur Reduktion des Volumens nach den verschiedenen Reinigungsschritten wurden 3 Verfahren ausprobiert. Erstens die Dialyse über Nacht, zweitens die Gelfiltration über Sephadex G_{15} oder G_{25} und drittens die Ultrafiltration mit dem Membranfiltergerät "Amicon". Die Gelfiltration benötigte am wenigsten Zeit, hatte aber den Nachteil, daß die Enzymfraktion zu stark verdünnt wurde. Die Ultrafiltration oder die Dialyse gegen Polyäthylenglykolhaltigen Puffer zur Verringerung des Volumens bewirkten eine empfindliche Verringerung der Enzymaktivität. Sie blieb besser erhalten wenn die Enzymlösungen durch Dialyse gegen Puffer IV entsalzt und gegen 50% Glyzerin in Puffer V eingeengt wurden.

Zur Optimierung des Reinigungsverfahrens wurden verschiedene Chromatographiesäulen parallel angewendet. Die Anionenaustauscher DEAE- Sephadex A_{50} und DEAE-Cellulose (DE 23) brachten beide gute Trennergebnisse. Mit Sephadex A_{50} war die Gesamtaktivität und der Reinigungsgrad höher. Diese Säule neigte aber bei höheren Ionenstärken (0,5 M KCl), während der Elution durch Verringerung des Bettvolumens zum Verstopfen, was zu Zeitverlusten führte (Sephadex ion exchangers, PHARMACIA). DE 23 war in dieser Hinsicht weniger empfindlich und wurde schließlich wegen der Wichtigkeit des Zeitgewinns weiterverwendet.

Bei den Kationenaustauschern wurden CM-Sephadex C_{50} und Phosphocellulose P_{11} verglichen . In Abb. 8 kann man am Elutions-

ABBILDUNG 8: CM-SEPHADEX-CHROMATOGRAPHIE (C_{50}) DER REVERSE TRANSKRIPTASE AUS MILZ VON FLV-INFIZIERTEN MÄUSEN

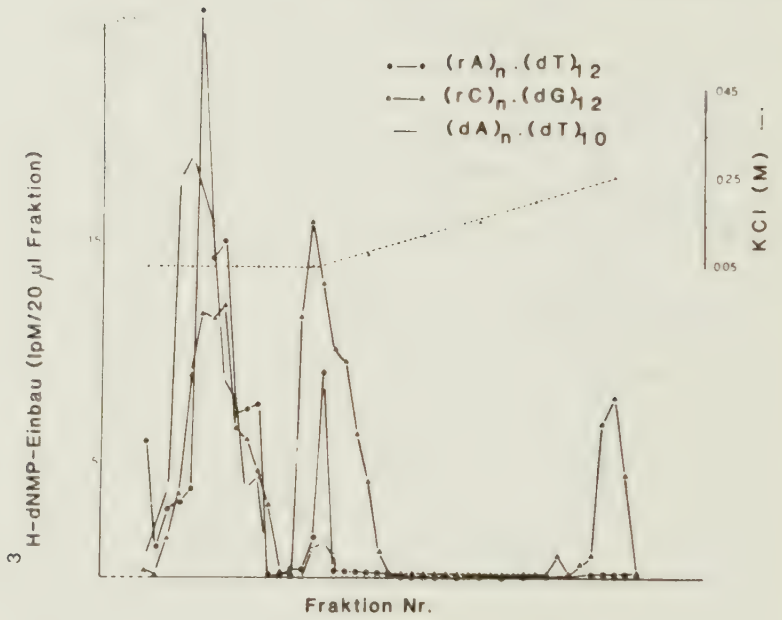


ABBILDUNG 9: AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE (POLY(C)-SEPHAROSE) VON DNA-POLYMERASEN AUS EINEM TUMOR DER MENSCHLICHEN MILZ

profil der Reverse Transkriptase aus FLV erkennen, daß CM-Sephadex eine sehr scharfe Trennung lieferte. Es trat aber mit einem Gradienten bis 1 M KCl gegen Ende der Elution eine starke Verringerung des Bettvolumens auf. Daraufhin wurde versucht diesen Nachteil durch die Verwendung von Phosphatpuffer anstelle des Tris-Puffers zu vermeiden. Als Folge davon wurde die DNA-Polymeraseaktivität aber stark verringert. MODAK und MARCUS (1977) geben in diesem Zusammenhang an, daß die Reverse Transkriptase von RLV schon durch geringe Phosphatkonzentrationen (0,5-50 mM) kompetitiv gehemmt wird.
Der Versuch diese Methoden durch eine Affinitätschromatographie mit Poly(C)-Sepharose zu ersetzen hatte unterschiedlichen Erfolg, weil dieses Gel nicht lange stabil blieb und seine Verwendung nicht immer möglich war. Außerdem wurde die Reverse Transkriptase hier nicht besonders effektiv abgetrennt.
Wie Abb. 9 am Beispiel der Isolation aus der Milz eines Leukämiepatienten zeigt, löste sich ein großer Anteil der $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität (vermutlich Reverse Transkriptase) beim Vorwaschen von dem Gel ab und wurde gemeinsam mit der $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$-abhängigen Enzymaktivität (vermutlich DNA-Polymerase ß) eluiert.
Aus allen diesen Gründen wurde die Phosphocellulosechromatographie (P_{11}) mit Tris-Puffer ausgewählt.

3.8. DURCHFÜHRUNG DER DNA-BIOSYNTHESE MIT DNA-POLYMERASEN

3.8.1. VORBEREITUNG DER LÖSUNGEN

Lösung 26 ^{3}H-dGTP-Lösung

Wäßrige Lösung:

1000 µCi/ml (85,47 µM)

Lösung 27 ^{3}H-dTTP-Lösung

Wäßrige Lösung:
1000 µCi/ml (23,81 µM)

Lösung 28 dCTP/dGTP-Lösung

Wäßrige Lösung:
200 µM dCTP und 180,8 µM dGTP in
50 mM Tris-HCl pH 7,5

Lösung 29 dATP/dTTP-Lösung

Wäßrige Lösung:
200 µM dATP und 180,8 µM dTTP in
50 mM Tris-HCl pH 7,5

Lösung 30 dCTP/dGTP/dATP/dTTP-Lösung

Wäßrige Lösung:
je 200 µM dNTP in 50 mM Tris-HCl pH 7,5

Lösung 31 dATP/dTTP/dCTP/dGTP-Lösung

Wäßrige Lösung:
je 200 µM dATP, dTTP, dCTP und 100 µM dGTP
in 50 mM Tris-HCl pH 7,5

Lösung 32 dGTP-Lösung

Wäßrige Lösung:
100 µM dGTP

Lösung 33 dATP/dTTP/dCTP-Lösung

Wäßrige Lösung:
je 200 µM dNTP in 50 mM Tris-HCl pH 7,5

Lösung 34 Matrize-Primer-Lösung

5 Optische Dichte (OD/ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5=
250 µg/ml:
a) Poly(rC).$(dG)_{12-18}$-Lösung
b) Poly(rC_m).$p(dG)_{12-18}$-Lösung

c) Poly(rA).$(dT)_{12}$-Lösung
d) Poly(dA).$(dT)_{10}$-Lösung
e) Aktivierte DNA-Lösung (nach SCHLABACH et al. 1971):
Native Lachsperma DNA (2,5 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 und 5 mM $MgCl_2$-Lösung wurde mit Desoxyribonuklease I aus Rinderpankreas (40 ng/mg DNA) für 25 Min. bei 37 °C inkubiert. Durch Erhitzen bei 60 °C für 10 Min. wurde anschließend die DNase inarktiviert. Die Lösung wurde gegen 50 mM Tris-HCl pH 7,5 dialysiert und mit derselben Lösung auf 5 OD/ml verdünnt.
f) Oligo p$(dT)_{12-18}$-Lösung
g) Oligo $(dG)_{12-18}$-Lösung
h) Poly(dA)-Lösung

Lösung 35 Tris-bzw. Tris-BSA-Lösung:

a) 50 mM Tris-HCl pH 7,5
b) 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und BSA 10 mg/ml

Lösung 36 $MnCl_2$-Lösung

Wäßrige Lösung:
a) 1 mM
b) 2 mM
c) 4 mM
d) 6 mM
e) 8 mM
f) 10 mM
g 12 mM

Lösung 37 $MgCl_2$-Lösung

Wäßrige Lösung:
a) 10 mM
b) 20 mM
c) 40 mM

d) 60 mM
e) 80 mM
f) 100 mM
g) 120 mM

Lösung 38 KCl-Tris-HCl-Lösung pH 7,5

Wäßrige Lösung:
a) 50 mM Tris-HCl und 200 mM KCl
b) 50 mM Tris-HCl und 400 mM KCl
c) 50 mM Tris-HCl und 600 mM KCl
d) 50 mM Tris-HCl und 800 mM KCl
e) 50 mM Tris-HCl und 1000 mM KCl
f) 50 mM Tris-HCl und 1200 mM KCl
g) 50 mM Tris-HCl und 1400 mM KCl

Lösung 39 Einbaupuffer ohne KCl

Wäßrige Lösung:
a) 200 mM Tris-HCl pH 7,0 und 8 mM DTT
b) 200 mM Tris-HCl pH 7,5 und 8 mM DTT
c) 200 mM Tris-HCl pH 8,0 und 8 mM DTT
d) 200 mM Tris-HCl pH 8,5 und 8 mM DTT
e) 200 mM Tris-HCl pH 9,0 und 8 mM DTT

Lösung 40 Einbaupuffer mit KCl

Wäßrige Lösung:
a) 200 mM Tris-HCl pH 7,5
8 mM DTT
400 mM KCl

b) 200 mM Tris-HCl pH 8,5
8 mM DTT
400 mM KCl

c) 200 mM Tris-HCl pH 9,0
8 mM DTT
200 mM KCl

d) 200 mM Tris-HCl pH 9,5
8 mM DTT
1400 mM KCl

Lösung 41 Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung pH 7,4

Wäßrige Lösung:

a) 5 mM
b) 10 mM
c) 20 mM
d) 40 mM
e) 50 mM
f) 67 mM

Lösung 42 Immunoglobulin G (Ig G)-Lösung

Die folgenden Antikörper wurden mit Lös. 35a auf die Konzentrationen 27 und 54 µg/15 µl verdünnt:

Goat anti FeLV-RT	6,4 mg/ml
Rabbit anti RLV-RT	5,4 mg/ml
Gibbon anti GaLV	4,9 mg/ml
Rabbit anti SiSV-RT	3,6 mg/ml
Rabbit anti RD 114-RT	4,1 mg/ml
Rabbit anti AMV-RT	10,0 mg/ml
Goat anti MF-RT	9,1 mg/ml
Rabbit präimmun	4,3 mg/ml

Lösung 43 Trichloressigsäure-Lösung

Wäßrige Lösung von 20 mM $Na_4P_2O_7$:

a) 10% (g/v)
b) 5% (g/v)

3.8.2. BESTIMMUNG DES DESOXYRIBONUKLEOTIDEINBAUES IN DIE DNA BZW. IN SYNTHETISCHE MATRIZEN-PRIMER

Die verschiedenen vorbereiteten Lösungen werden im Gefrierschrank bei -30 °C aufbewahrt. Die Reaktionskomponenten werden gemäß der Reihenfolge in den Tabellen 3-7 zusammenpipettiert und 30 Min. bei 37 °C inkubiert.
Danach werden 20 µl BSA (3,6 mg/ml) als Trägerprotein und 3 ml eiskalte TCA-Lösung (Lösung 43a) zum Unterbrechen der

DNA-Synthese zugegeben. Die Proben werden noch 30 Min. auf Eis stehen gelassen und anschließend über Glasfaserfilter (GF/C Whatman) abfiltriert. Das Präzipitat wird 5 mal mit 5 ml TCA-Lösung (Lösung 43b) und noch 2 mal mit 70% Äthanol gewaschen. Die Filter werden in Szintillatorflaschen gesteckt, 30 Min. bei 100 ^{o}C getrocknet, nach dem Abkühlen mit 10 ml Toluolszintillationsflüssigkeit gefüllt (Quickszint 501), und etwas geschwenkt, um eventuell vorhandene Luftblasen entweichen zu lassen.
Dann wird die Radioaktivität im Szintillationsspektrometer (Isocap/300) gemessen.
Zur Korretur der Meßwerte werden auch Reaktionsgemische hergestellt, die anstatt der Enzymlösung das gleiche Volumen Tris-HCl (Lösung 35a) enthalten. Ihre Radioaktivität (IpM) wird von der der enzymhaltigen Proben immer abgezogen.
Bei der endogenen Reaktion wird kein Matrizen-Primer verwendet, sondern stattdessen Tris-HCl-Puffer (Lösung 35a).

3.8.3. SYSTEM ZUR UNTERSUCHUNG DER DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT

TABELLE 3: VERWENDETE MATRIZE-PRIMER: $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$

Substanz	Lösung	Volumen (µl)	Konzentrationen in Ansatz
^{3}H-dGTP	26	5	5 µCi (2350 IpM/pMol)
dCTP/dGTP	28	5	26,6 µM 5 mM Tris-HCl pH 7,5
$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$	34a	5	0,5 OD/ml 5 mM Tris-HCl pH 7,5
Tris-BSA	35b	5	5 mM Tris-HCl pH 7,5
$MnCl_2$	36f		1,0 mM
oder		5	
$MgCl_2$	37f		1,0 mM
Einbaupuffer	40b		20 mM Tris-HCl pH 8,5 0,8 mM DTT
oder		5	40 mM KCl
Einbaupuffer	40a		40 mM KCl pH 7,5
Enzymlösung		20	15 mM Tris-HCl pH 7,5 0,4 mM DTT 20 mM KCl
Gesamtvolumen		50	50 mM Tris-HCl pH 7,5 oder pH 8,3 1,2 mM DTT 60 mM KCl

TABELLE 4: VERWENDETE MATRIZE-PRIMER: $(rC_m)_n.(dG)_{12-18}$

Substanz	Lösung	Volumen (µl)	Konzentrationen in Ansatz
^{3}H-dGTP	26	5	5 µCi (2350 IpM/pMol)
dCTP/dGTP	28	5	26,6 µM 5 mM Tris-HCl pH 7,5
$(rC_m)_n.(dG)_{12-18}$	34b	5	0,5 OD/ml 5 mM Tris-HCl pH 7,5
Tris-BSA	35b	5	5 mM Tris-HCl pH 7,5
$MnCl_2$	36d	5	0,6 mM
Einbaupuffer	40a	5	20 mM Tris-HCl pH 7,5 0,8 mM DTT 40 mM KCl
Enzymlösung		20	15 mM Tris-HCl pH 7,5 0,4 mM DTT 20 mM KCl
Gesamtvolumen		50	50 mM Tris-HCl pH 7,5 1,2 mM DTT 60 mM KCl

TABELLE 5: VERWENDETE MATRIZE-PRIMER: $(rA)_n.(dT)_{12}$

Substanz	Lösung	Volumen (µl)	Konzentrationen in Ansatz
^{3}H-dTTP	27	5	5 µCi (3500 IpM/pMol)
dATP/dTTP	29	5	26,6 µM 5 mM Tris-HCl pH 7,5
$(rA)_n.(dT)_{12}$	34c	5	0,5 OD/ml 5 mM Tris-HCl pH 7,5
Tris-BSA	35b	5	5 mM Tris-HCl pH 7,5
$MnCl_2$	36f		1,0
oder		5	
$MgCl_2$	37a oder g		1 oder 12 mM
Einbaupuffer	40a	5	20 mM Tris-HCl pH 7,5 0,8 mM DTT 40 mM KCl
Enzymlösung		20	15 mM Tris-HCl pH 7,5 0,4 mM DTT 20 mM KCl
Gesamtvolumen		50	50 mM Tris-HCl pH 7,5 1,2 mM DTT 60 mM KCl

TABELLE 6: VERWENDETE MATRIZE-PRIMER: $(dA)_n.(dT)_{10}$

Substanz	Lösung	Volumen (µl)	Konzentrationen in Ansatz
^{3}H-dTTP	27	5	5 µCi (3500 IpM/pMol)
dATP/dTTP	29	5	26,6 µM 5 mM Tris-HCl pH 7,5
$(dA)_n.(dT)_{10}$	34d	5	0,5 OD/ml 5 mM Tris-HCl pH 7,5
Tris-BSA	35b	5	5 mM Tris-HCl pH 7,5
$MnCl_2$	36e	5	0,8 mM
Einbaupuffer	40d	5	20 mM Tris-HCl pH 9,5 0,8 mM DTT 140 mM KCl
Enzymlösung		20	15 mM Tris-HCl pH 7,5 0,4 mM DTT 20 mM KCl
Gesamtvolumen		50	50 mM Tris-HCl pH 8,7 1,2 mM DTT 160 mM KCl

TABELLE 7: VERWENDETE MATRIZE-PRIMER: "aktivierte DNA"

Substanz	Lösung	Volumen (µl)	Konzentrationen in Ansatz
^{3}H-dTTP	27	5	5 µCi (3500 IpM/pMol)
dATP/dTTP/ dCTP/dGTP	31	5	26,6 µM 5 mM Tris-HCl pH 7,5
"aktivierte DNA"	34e	5	0,5 OD/ml 5 mM Tris-HCl pH 7,5
Tris-BSA	35b	5	5 mM Tris-HCl pH 7,5
$MgCl_2$	37c	5	4 mM
Einbaupuffer	40c	5	20 mM Tris-HCl pH 9,0 0,8 mM DTT 20 mM KCl
Enzymlösung		20	15 mM Tris-HCl pH 7,5 0,4 mM DTT 20 mM KCl
Gesamtvolumen		50	50 mM Tris-HCl pH 8,4 1,2 mM DTT 40 mM KCl

3.9. METHODEN ZUR BIOCHEMISCHEN CHARAKTERISIERUNG DER GEREINIGTEN DNA-POLYMERASEN

3.9.1. ABHÄNGIGKEIT DER ENZYMAKTIVITÄT VON IONEN

Der Einfluß von K^+, Mn^{++}, Mg^{++} und HPO_4^{--}-Ionen wird bei verschiedenen Konzentrationen untersucht.
Um die optimale KCl-Konzentration bestimmen zu können, wird sie in den Reaktionsgemischen zwischen 20 und 120 mM variiert, wobei die anderen Bedingungen, entsprechend der Tabelle 5 möglichst günstig für die Reaktion von DNA-Polymerasen gehalten werden. Wie die Tabelle 8 zeigt, nimmt man also 5 µl der verschiedenen KCl-Lösungen (Lösung 38 a-e), sowie 5 µl Einbaupuffer ohne KCl (Lösung 39b oder d, entsprechend der zu untersuchenden Fraktion) und ersetzt mit diesen die Tris-BSA-Lösung (Lösung 35b) sowie den KCl-haltigen Einbaupuffer (Lösung 40, a-b) der Systeme aus Abschnitt 3.8.3. Die anderen Bestandteile bleiben unverändert; das Gesamtvolumen beträgt 50 µl.
Entsprechende Abänderungen werden bei der Untersuchung das optimalen Bedarfs an Mn^{++}- und Mg^{++}-Ionen vorgenommen (vergl. Tabelle 8). Die verwendeten Lösungen (Lösung 36, a-g und Lösung 37, a-g) erzeugen ein Mileu ansteigender Konzentrationen von 0,1-1,2 mM für Mn^{++} und 1-12 mM für Mg^{++}. Die Reaktionsgemische entsprechen sonst den Tabellen in Abschnitt 3.8.3. Die KH_2PO_4-Lösung (Lösung 41, a-f) wird in den Reaktionsgemischen anstelle von Tris-BSA-Lösung (Lösung 35b) in unterschiedlichen Mengen zugesetzt.

3.9.2. PH-ABHÄNGIGKEIT DER ENZYMAKTIVITÄT

Um den Einfluß unterschiedlicher pH-Werte auf die Enzymaktivität zu untersuchen, wird wieder der Reaktionsansatz nach der Tabelle 8 zugrundegelegt. Der pH-Wert wird variiert indem der KCl-haltige Einbaupuffer (Lösung 40a-b) durch KCl-freien Einbaupuffer mit verschiedenen pH-Werten (7,0-9,0) ersetzt wird (Lösung 39, a-e).

TABELLE 8: ZUSAMMENSETZUNG DER REAKTIONSGEMISCHE FÜR DIE DNA-BIOSYNTHESE ZUR UNTERSUCHUNG DER ABHÄNGIGKEIT VON DEN Mn^{++}-, Mg^{++}-, K^{+}- UND H^{+}-IONENKONZENTRATIONEN.

Substanz	Lösung	Volumen (µl)	Konzentrationen in Ansatz
^{3}H-dGTP bzw. ^{3}H-dTTP	26 bzw. 27	5	5 µCi
dCTP/dGTP bzw. dATP/dTTP	28 bzw. 29	5	26,6 µM 5 mM Tris-HCl
$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ bzw. $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$	34a 34c	5	0,5 OD/ml 5 mM Tris-HCl
$MnCl_2$ oder $MgCl_2$	36a-g 37a-g	5	0,1-1,2 mM 1,0-12 mM
Tris-BSA oder KCl-Tris-HCl	35b 38a-e	5	5 mM Tris-HCl oder 20-100 mM KCl
Einbaupuffer oder Einbaupuffer	39a-e 40a-b	5	20 mM Tris-HCl 0,8 mM DTT oder 20 mM Tris-HCl 0,8 mM DTT 40 mM KCl
Enzymlösung		20	15 mM Tris-HCl 0,4 mM DTT 20 mM KCl
Endvolumen		50	50 mM Tris-HCl 1,2 mM DTT 60 mM KCl

Die resultierenden pH-Werte des Reaktionsgemischs zeigt Tabelle 9.

TABELLE 9: RESULTIERENDE PH-WERTE IN DEN REAKTIONSGEMISCHEN

pH-Wert der Tris-BSA-Lös. 5 µl	pH-Wert des Einbaupuffers 5 µl	gemessener resultierender pH-Wert im Reaktionsansatz 50 µl
7,5	7,0	7,3
7,5	7,5	7,5
7,5	8,0	7,9
7,5	8,5	8,3
7,5	9,0	8,4

3.9.3. ABHÄNGIGKEIT DER GEREINIGTEN DNA-POLYMERASE-AKTIVITÄT VON MATRIZEN-PRIMERN

Um den Einfluß des Matrizen-Primers auf die Polymerase-Reaktion zu untersuchen, wurden folgende Polymere verwendet:

Poly(rC).$(dG)_{12-18}$-Lösung (Lösung 34a)
Poly(rC_m).$(dG)_{12-18}$-Lösung (Lösung 34b)
Poly(rA).$(dT)_{12}$-Lösung (Lösung 34c)
Poly(dA).$(dT)_{12}$-Lösung (Lösung 34d)
"aktivierte DNA"-Lösung (Lösung 35e)

Entsprechend den verwendeten Matrizen müssen die Konzentrationen der anderen Bestandteile der Reaktionsgemische angepaßt sein. Die optimalen Bedingungen sind aus den Tabellen 3-7 (Abschnitt 3.8.3.) zu entnehmen.

3.9.4. TRANSKRIPTION GEREINIGTER 70 S RNA

Die Reinigung der 70 S RNA aus AMV wurde schon im Abschnitt 3.5. beschrieben. Um nachzuprüfen, in welchem Umfang die gereinigten DNA-Polymerasen die natürliche virale RNA transkribieren können, wird der DNA-Synthese-Ansatz (Tabellen 3 und 5) folgendermaßen abgeändert:

a) Bei der Verwendung von ^{3}H-dGTP müssen statt dCTP/dGTP (Lösung 28) alle vier nicht markierten Nukleotidtriphosphate dCTP/dGTP/dATP/dTTP (Lösung 29) verwendet werden und bei ^{3}H-dTTP anstatt dATP/dTTP (Lösung 29) die gleichen vier Triphosphate.
b) Als Matrize wird die 70 S RNA ohne exogenen Primer eingesetzt oder
c) im Kontrollexperiment der Primer Oligo p(dT)$_{12-18}$ (Lösung 34f) alleine oder
d) 70 S RNA wird zusammen mit dem exogenen Primer verwendet, der anstelle von Tris-BSA (Lösung 35b) zugegeben wird.

3.9.5. UNTERSUCHUNG AUF TERMINALDESOXYRIBONUKLEOTIDYL-TRANSFERASE (nach SARIN und GALLO 1975)

Die gereinigte RT-Fraktion wurde auf die Enzymaktivität der TdT untersucht. Das Reaktionsgemisch enthielt ^{3}H-dGTP als markiertes Triphosphat, dGTP (Lösung 32) und den Primer Poly(dA) (Lösung 34h), oder die Triphosphate dATP/dTTP/dCTP (Lösung 33) mit dem Primer Oligo p(dT)$_{12-18}$ oder Oligo(dG)$_{12-18}$ (Lösung 34f und g). Die übrigen Bestandteile wurden in den optimalen Konzentrationen verwendet, die in Tabelle 3 angegeben sind.

3.9.6. TEMPERATURSTABILITÄT DER DNA-POLYMERASEAKTIVITÄTEN

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität der DNA-Polymerasen, werden die Enzymfraktionen bei 45 ^{o}C vorinkubiert und anschließend ihre Enzymaktivitäten bei 37 ^{o}C, wie unter Ab-

schnitt 3.8.3. angegeben ist, gemessen. Zur Vorinkubation wird die Enzymlösung mit einer Lösung von 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl und 0,48 mg/ml BSA 1:5 verdünnt (DUBE et al. 1979). Zu bestimmten Zeiten (2, 4, 6, 10, 20 und 30 Minuten) werden 20 µl entnommen und für 30 Minuten in vorbereitete Reaktionsgemische von 37 °C gegeben.

3.10. HEMMUNG DER GEREINIGTEN REVERSE TRANSKRIPTASE DURCH NEUTRALISIERENDE ANTIKÖRPER

Die Antikörper gegen RT (Lösung 42) aus verschiedenen Retroviren und die normalen Immunoglobuline (aus Serum der noch nicht immunisierten Tiere) werden mit Tris-HCl-Puffer (Lösung 35a) verdünnt, so daß die Konzentrationsstufen 27 und 54 µg/15 µl Tris-HCl-Puffer erreicht werden. Dann werden in zwei Parallelproben 5 µl jeder Lösung mit 5 µl Tris-BSA (Lösung 35b) und 10 µl Enzymlösung gemischt und bei 4 °C auf Eis stehen gelassen. Nach vier Stunden wird die DNA-Polymeraseaktivität gemessen wie unter 3.8.3. beschrieben. Dabei werden die Proben 60 Minuten anstatt 30 Minuten inkubiert.

3.11. ELEKTROPHORESE

Die Elektrophorese ist ein elektrokinetischer Vorgang, bei dem gelöste oder kolloidal verteilte Teilchen unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes wandern.
Sie unterscheidet sich von der Isoelektrofokusierung dadurch, daß bei einem Proteingemisch die unterschiedliche Wandergeschwindigkeit oder Richtung der Molekülsorten zur Trennung führt. Diese hängt ab:

a) von der elektrostatischen Nettoladung der Proteinmoleküle. Die Ladung kann über die Anlagerung oder Abspaltung von Wasserstoffionen an den Aminosäureresten mit Hilfe des pH-Werts des Puffermediums eingestellt und konstant gehalten werden;
b) von der molekularen Größe und Gestalt der Moleküle;

c) vom Trägermedium, welches eine stationäre Phase darstellt. Man verwendet dazu mehr oder weniger stark vernetze Gele. Proteinmoleküle mit höherem Molekulargewicht sind auch größer und durchwandern deshalb die Poren des Gels langsamer.

3.11.1. SDS POLYACRYLAMIDGEL ELEKTROPHORESE

Um das Molekulargewicht von Proteinen zu bestimmen, kann man die Elektrophorese mit SDS durchführen. Der Zusatz des Detergenz bewirkt, daß die Oberflächenspannung zwischen Proteinen und Wasser herabgesetzt wird, und die Polypeptidketten aufgefaltet werden. Die SDS-Anionen, welche von den denaturierten Proteinmolekülen gebunden werden, verleihen diesen eine negative Ladung so daß der Komplex im elektrischen Feld in Richtung Anode wandert.
Die elektrophoretische Beweglichkeit hängt dann von der Grösse der Gelporen und von der Kettenlänge und damit vom Molekulargewicht des Proteins ab.
Man bestimmt das ungefähre Molekulargewicht gegebener Proteine durch Vergleich mit der Wandergeschwindigkeit von bekannten Marker-Proteinen (WEBER und OSBORN 1969; SHAPIRO et al. 1967). Trägt man den Logarithmus des Molekulargewichtes gegen die effektive Beweglichkeit graphisch auf, so erhält man eine lineare Beziehung.

Durchführung:
Nach LAEMMLI (1970) erreicht man die beste Auftrennung und Verschärfung der Proteinbanden in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel (PAG), welches drei verschiede Gradienten enthält und zwar hinsichtlich des pH-Wertes, des Puffertyps und der Porengröße.
Das in dieser Arbeit verwendete diskontinuierliche PAG-System ist eine Modifikation der Methoden von LAEMMLI (1970) und ELGIN (1975).
Für das engporige Trenngel werden folgende Puffer und Monomere in wäßriger Lösung verwendet:

Lösung 44 Lösung A:

0,4% (v/v) TMED

Lösung 45 Lösung B:

30% (g/v) Acrylamid
0,8% (g/v) Methylenbisacrylamid
in 100 ml dest. Wasser

Lösung 46 Lösung C:

0,3% (g/v) Ammoniumpersulfat
(Vor Gebrauch frisch herzustellen)

Lösung 47 Lösung D:

1,5 M Tris-HCl pH 8,8
0,4% (g/v) SDS

Man mischt:

2 ml Lösung A
10 ml Lösung B
3 ml Lösung C
15 ml Lösung D

Nachdem die Lösungen gemischt sind, bringt man sie zum Entgasen unter ein Vakuum. Dann wird die aus den Glasplatten zusammengesetzte Gelkammer (110x250x1,5 mm) des Elektrophoresegerätes aufrecht gestellt und die Gelmischung mit Hilfe einer Spritze sehr langsam, bis etwa 3 cm unter den oberen Rand eingefüllt. Man überschichtet sofort mit bidest. Wasser damit die Geloberfläche eben wird und Luftsauerstoff die Polymerisation nicht hemmen kann. Die Verfestigung des Trenngels benötigt einige Stunden bei Zimmertemperatur.
Die Endkonzentrationen im Trenngel sind:

0,037% TMED
10,0% Acrylamid
0,27% Methylenbisacrylamid
0,03% Ammoniumpersulfat

0,2% SDS
750 mM Tris-HCl (pH 8,8)

Nun werden die Lösungen für das weitporige Sammelgel vorbereitet, welches dem Trenngel vorgeschaltet wird:

Lösung 48 Lösung E:

0,1% (g/v) Ammoniumpersulfat

Lösung 49 Lösung F:

250 mM Tris-HCl pH 6,8
0,4% (g/v) SDS

Man mischt:

1 ml Lösung A
1 ml Lösung B
3 ml Lösung E
5 ml Lösung F

Das Gemisch wird sofort für 45 Sekunden entgast, das Schutzwasser auf dem Trenngel mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und durch das Sammelgelgemisch ersetzt. Nachdem ein Kamm zum Prägen von Probentaschen eingesetzt wurde, kann das Gel über Nacht bei Zimmertemperatur polymerisieren.
Die Endkonzentrationen im Sammelgel sind:

0,04% TMED
3,0 % Acrylamid
0,08 % Methylenbisacrylamid
0,03 % Ammoniumpersulfat
0,2% SDS
125 mM Tris-HCl (pH 6,8)

Die Proteinproben werden für die Trennung vorbereitet, indem sie mit folgendem Puffer 1:2 verdünnt werden:

Lösung 50 Auftragpuffer pH 6,8:

125 mM Tris-HCl
10 mM DTT
20% (g/v) Saccharose
4% (g/v) SDS

Dadurch erhält man als Endkonzentrationen:

67,5 mM Tris-HCl
5 mM DTT
10% Saccharose
2% SDS

Die Proben sollen nach Möglichkeit etwa 2 mg/ml Proteine enthalten. Dazu werden die Fraktionen der Phosphocellulose-Chromatographie und der IEF vorher mit Hilfe der Ultrafiltration (Amicon) möglichst stark konzentriert. Nach der Zugabe von SDS werden die Proben für 5 Min. auf 100 °C erhitzt. Nachdem der Kamm aus dem Sammelgel entfernt ist, wird die Oberfläche abgespült und die Proben können in die 12 Geltaschen gefüllt werden und zwar 5 µl der Markerproteinlösung, 40 µl aus den konzentrierten Phosphocellulosefraktionen und 20 µl von allen anderen Proteinfraktionen. Zur Markierung der Wanderfront dient 0,1% Bromphenolblau als 20%ige Lösung in Glyzerin, von der 2 µl in jede Geltaschen gegeben werden. Zusammensetzung des Elektrodenpuffers (5000 ml):

Lösung 51 Elektrodenpuffer pH 8,3:

25 mM Tris-HCl
192 mM Glyzerin
0,1% (g/v) SDS

Das Elektrophoresegerät (Desaga) wird an seine Spannungsquelle angeschlossen und mit 30 mA betrieben, bis das Bromphenolblau ins Sammelgel eingedrungen ist. Dann wird die Pumpe zum Umwälzen des Puffers zwischen den Elektrodenräumen eingeschaltet und die Stromstärke auf 60 mA erhöht. Die Proteine wandern von der oben befindlichen Kathode (-) zur unten befindlichen

Anode (+); das Ende der Trennung ist erreicht wenn das Bromphenolblau etwa 1 cm über dem unteren Rand des Trenngels angelangst ist.

Lösung 52 Fixierlösung:

50% (g/v) TCA

Lösung 53 Färbelösung:

0,04% Serva R 250 Blau
in 12% (g/v) TCA
(Vor Gebrauch zu filtrieren)

Lösung 54 Entfärbelösung:

10% (v/v) Essigsäure

Das Gel wird erst für 30 Minuten in ein Fixierbad (Lösung 52), dann bei 60 ^{o}C für 20 Minuten in eine Färbelösung (Lösung 53) und dann in das Entfärbebad (Lösung 54) gelegt. Diese Lösung wird mehrmals gewechselt bis das Gel hell geworden ist.
Die Intensität und Lage der verschiedenen sichbaren Banden werden für jede Probe mit einem Densitometer (Desaga) registriert. Die Wanderstrecken der Banden werden ausgemessen und die oben beschriebene Graphik nach WEBER und OSBORN (1969) angefertigt.

4. ERGEBNISSE

4.1. REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER REVERSE TRANSKRIPTASE AUS EINEM KARZINOM DES OVARS

Die Reinigung der Reverse Transkriptase erfolgte nach dem Schema von Abb. 10. Nach jedem Reinigungsschritt wurden die DNA-Polymeraseaktivitäten in den Fraktionen gemessen (vergl. Tabellen 3 bis 7, Abschnitt 3.8.3.). Die Verwendung spezifischer exogener Matrizen und bivalenter Kationen ermöglichte die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Enzymen.
Die DNA-Polymerase α benutzt als Matrize praktisch nur "aktivierte DNA", die DNA-Polymerase β dagegen vorwiegend $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$, und Reverse Transkriptase sowie DNA-Polymerase γ sind mit $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ besonders aktiv (SARNGADHARAN et al. 1978). Die Unterscheidung zwischen den letzten beiden ist durch den Matrizen-Primer $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ möglich, zu dem die Reverse Transkriptase eine sehr hohe Affinität hat, während die DNA-Polymerase γ ihn nur in geringerem Maße verwendet. Außerdem transkribiert die Reverse Transkriptase auch die synthetische Matrize $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$, die von keiner der zellulären DNA-Polymerasen angenommen wird (SPADARI und WEISSBACH 1974; GERARD et al. 1974; GERARD 1975; KNOPF et al. 1976; ROBERT-GUROFF et al. 1977).

4.1.1. EXTRAKTION

Die erste Phase der Enzymextraktion bestand darin, die Zellkerne und die Mitochondrien vom Cytoplasma abzutrennen.
Der bei der Zentrifugation erhaltene Überstand bildete die Fraktion I.
Wie man aus Tabelle 10 entnehmen kann, wurde die Matrize $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ mit sehr geringer spezifischer Aktivität abgelesen. Dies erklärt sich dadurch, daß sie sehr empfindlich gegenüber den im Rohextrakt enthaltenen Ribonukleasen ist. Immerhin deutete die Verwendung der sehr spezifischen Matri-

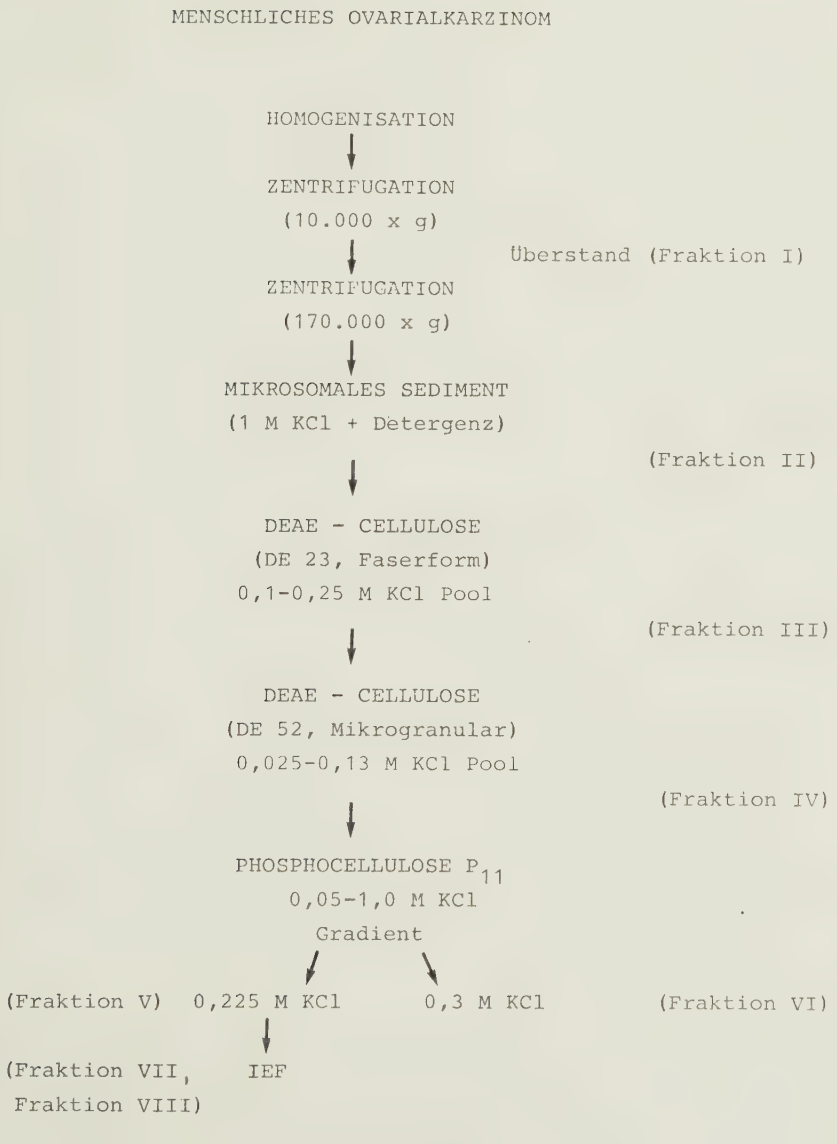


ABBILDUNG 10: SCHEMA ZUR REINIGUNG DER REVERSE TRANSKRIPTASE AUS EINEM OVARIALKARZINOM

ze $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ auf einen möglichen Gehalt an Reverse Transkriptase hin. Die hohen Werten für die anderen Matrizen zeigten, daß zelluläre DNA-Polymerasen vorhanden waren. Dies war zu erwarten, weil sich die Polymerasen α und β nicht nur an der Membraninnenseite des Zellkerns, sondern auch im perinuklearen Raum befinden und weil Polymerase γ-ähnliche Aktivität in den Mitochondrien vorkommt, die im Extrakt zurückgeblieben sein können (BOLLUM 1975; FOSTER et al. 1976; DE PHILIP et al. 1977). Die Aktivitäten, mit denen die enthaltenen DNA-Polymerasen die Matrizen $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$, $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ bzw. "aktivierte DNA" benutzten, lagen etwa 12 mal, 1,4 mal, bzw. 3,5 mal höher als bei $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$. Es ist jedoch an dieser Stelle noch sehr schwer zu entscheiden, um welche der zellulären DNA-Polymerasen es sich vorwiegend handelt.

Es ist auch mitzuberücksichtigen, daß in dem Homogenat viele Bruchstücke von Nukleinsäuren enthalten sind, die von den DNA-Polymerasen abgelesen werden können. Wenn man dem Rohextrakt eine bestimmte exogene Matrize zusetzt, kann man deshalb nicht sicher sein, daß die gemessene Polymeraseaktivität für ein bestimmtes Enzym spezifisch ist.
Durch die endogene DNA-Polymeraseaktivität, die ohne die Zugabe exogener synthetischer Matrizen-Primer gefunden wurde (Werte in Klammern, Tabelle 10), wird die Überlegung bestätigt, daß ein Teil der Polymerasen an endogene Nukleinsäuren gebunden ist und diese gut abliest. Die endogene spezifische Aktivität liegt beim ^{3}H-dGMP-Einbau 1,5 mal und beim ^{3}H-dTMP-Einbau 1,7 mal höher als in Gegenwart der exogenen Matrizen für die reverse Transkription.

Als nächste Phase der Extraktion wurden die verbliebenen subzellulären Partikel des Zellplasmas durch Zentrifugation isoliert und die Enzymaktivität durch Erhöhen der Salzkonzentration (1 M KCl) und durch ein nichtionisches Detergenz in Lösung gebracht (Fraktion II). Dadurch nahm die spezifische DNA-Polymeraseaktivität mit der Matrize $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$ auf das 0,7-fache des Vergleichswerts aus der vorherigen Fraktion ab, während sie bei den anderen synthetischen Ma-

TABELLE 10: SPEZIFISCHE DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT WÄHREND DER REINIGUNG DER REVERSE TRANSKRIPTASE AUS OVARIALKARZINOM IN ABHÄNGIGKEIT VON VERSCHIEDENEN MATRIZEN-PRIMERN

		Einbau von ^{3}H-dNMP in DNA (pMol/30 Minuten/mg Protein)				
		^{3}H-dGMP	^{3}H-dGMP	^{3}H-dTMP	^{3}H-dTMP	^{3}H-dTMP
		Zur Untersuchung der Fraktionen verwendete Matrizen-Primer:				
	Fraktion	$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$	$(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$	$(rA)_n \cdot (dT)_{12}$	$(dA)_n \cdot (dT)_{10}$	aktiv. DNA
I	Rohextrakt	0,39 (0,6)*	0,27	0,53 (o,88)*	4,52	1,34
II	Mikrosomales Pellet	2,37 (1,9)*	2,13	1,94 (2,10)*	2,94	2,17
III	DE 23, Pool (0,1-0,25 M KCl)	6,36	6,08	6,46	6,05	9,35
IV	DE 52, Pool (0,025-0,13 M KCl)	12,23	11,20	22,24	139,58	13,57
V	P 11 (0,225 M KCl)	129,6	106,4	90,6	0	9,68
VI	P 11 (0,3 M KCl)	61,8	0	795,2	27,32	24,38
VII	IEF (IP 6,6)	(min. 236)**	(min. 148)**	(min. 51)**	0	(min. 14)**
VIII	IEF (IP 5,6)	(min. 265)**	(min. 249)**	(min. 19)**	0	(min. 15)**

*(endogene Enzymaktivität)

**(Diese Werte wurden auf die gesamte für die Trennung verwendete Proteinmenge bezogen und stellen deshalb Mindest-Werte dar).

trizen zunahm. Die $(rC)_n.(dG)_{12-18}$-abhängige Aktivität, die weitgehend durch Reverse Transkriptase bestimmt wird, stieg auf das 6-fache an und die Transkription von $(rC_m)_n.(dG)_{12-18}$ nahm etwa 7,9-fach zu. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Reverse Transkriptase aus dem Nukleoproteid-Komplex mit RNA herausgespalten wurde und nun eher die exogenen, synthetischen Matrizen verwenden konnte. Die für DNA-Polymerase γ und Reverse Transkriptase spezifische Matrize $(rA)_n.(dT)_{12}$ wurde 3,7 mal besser abgelesen und mit "aktivierter DNA" war nur eine 1,6-fache Zunahme zu verzeichnen.
Auch die endogene Aktivität der mikrosomalen Fraktion zeigte gegenüber der cytoplasmatischen Fraktion einen 3-fachen Anstieg.

4.1.2. SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Für die erste Phase der Reinigung des Enzyms wurde eine DEAE-Cellulosesäule (DE 23) benutzt. Dieser Reinigungsschritt diente im Wesentlichen dazu, die Nukleinsäuren abzutrennen. Die Bestimmung des RNA-Gehalts im Eluat läßt erkennen, daß sie schon beim Vorwaschen der Säule entfernt wurden (Abb. 11). Die Proteine wurden mit einem linearen KCl-Gradienten von 0,05-0,35 M eluiert und das Profil der DNA-Polymeraseaktivität in Abb. 11 zeigt zwischen 0,1-0,25 M KCl Fraktionen an, die die Reverse Transkriptase-Aktivität enthalten mußten. Sie wurden vereinigt, dialysiert und bildeten die Fraktion III. Die mit den verschiedenen Primer-Templates meßbaren Enzymaktivitäten sind darin nur leicht angestiegen (2-fach mit $(dA)_n.(dT)_{10}$ und 4,3-fach mit "aktivierter DNA" und etwa 3-fach für die anderen Matrizen). Durch das Entfernen der Nukleinsäuren wurde die endogene Enzymaktivität praktisch gleich Null und brauchte in den folgenden Reinigungsstufen nicht mehr untersucht zu werden.

Bei dem nächsten Reinigungsschritt mit DEAE-Cellulose (DE 52). wurden die Enzyme mit einem linearen KCl-Gradienten von 0,01-0,5 eluiert und der Bereich zwischen 0,025-0,13 M KCl,

ABBILDUNG 11: DEAE-CELLULOSE-CHROMATOGRAPHIE (DE 23) DER MIKROSOMALEN FRAKTION.
Die Einzelheiten der quantitativen Bestimmungen von Ribonukleinsäure und des Nachweises der DNA-Polymerasen mit Hilfe der DNA-Biosynthese sind unter Abschnitt 3.4. und 3.8.3. beschrieben.
Abszisse : Fraktionsnummer der eluierten Proben.
Ordinaten: DNA-Polymeraseaktivität,
Konzentration der Gradienten und
UV-Extinktion durch Proteine
O—O RNA-Bestimmung (der Maximalwert entspricht 1260 µg/ml).
▲—▲ $(rC)_n.(dG)_{12-18}$
●—● $(rA)_n.(dT)_{12}$.

der die gesuchte Aktivität enthielt, (Abb. 12) bildete die Fraktion IV. Mit diesem Ionenaustauscher sollten die DNA-Polymerasen α und γ von der Reverse Transkriptase und der DNA-Polymerase β abgetrennt werden. Aus einer Reihe von Untersuchungen, die zur Charakterisierung der zellulären Polymerasen unternommen wurden, ist bekannt, daß die Polymerasen α und γ bei DE 52-Säulen erst mit einem diskontinuierlichen Gradienten von 0,3 M KCl eluiert werden (LEWIS et al. 1974; KNOPF et al. 1976; ROBERT-GUROFF 1977; SARNGADHARAN et al. 1978; CHANDRA et al. 1981). Die weitgehende Abtrennung der Polymerase α ist auch an den Werten der Tabelle 10 zu erkennen: die spezifische Enzymaktivität der Fraktion IV stieg mit "aktivierter DNA" im Vergleich zur vorhergehenden Fraktion nur auf das 1,4-fache an, mit $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ dagegen auf das Doppelte. Die $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$-abhängige Aktivität der β Polymerase, von der bekannt ist, daß sie aus DE 52-Säulen bei 0,05 M KCl eluiert wird, nahm durch den Reinigungsschritt um das 23-fache zu. Schwieriger zu erkennen ist hier, wie vollständig die Abtrennung der DNA-Polymerase γ gelungen ist, denn die Enzymaktivität für $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ nimmt um das 3,4-fache zu. Diese Matrize wird aber auch von Reverse Transkriptase gut abgelesen.

Die dritte chromatographische Trennung wurde mit Phosphocellusose (P 11) durchgeführt. Hier wurden mit einem linearen KCl-Gradienten von 0,05-1,0 M zwei DNA-Polymerase-Peaks, einer bei 0,225 M KCl und ein zweiter bei 0,3 M KCl eluiert (Abb. 13). Der Bereich des Gradienten von 0,22-0,26 KCl wurde zur Fraktion V vereinigt und der Bereich von 0,27-0,34 M bildete die Fraktion VI.
Die Fraktion VI war in der Lage alle synthetischen Matrizen gut zur transkribieren, außer $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ (Tabelle 10). Vor allem ihre Affinität zu dem Template-Primer $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ war 36 mal höher als in der vorhergehenden Fraktion IV des DE 52-Pools. Diese Befunde weisen darauf hin, daß das bei 0,30 M KCl aus der Phosphocellulose-Chromatographie eluierte Enzym DNA-Polymerase γ darstellt. Verschiedene Arbeiten, die über DNA-Polymerase γ veröffentlicht wurden, bestätigen

ABBILDUNG 12: DEAE-CELLULOSE-CHROMATOGRAPHIE (DE 52) DER FRAKTION III (0,1-0,25 M KCL POOL DER DEAE-CELLULOSESÄULE (DE 23)).
Die Einzelheiten des Nachweises der DNA-Polymerasen mit Hilfe der DNA-Biosynthese, sind unter Abschnitt 3.8.3. beschrieben.
Abszisse : Fraktionsnummer der eluierten Proben.
Ordinaten: DNA-Polymeraseaktivität,
Konzentration des Gradienten und
UV-Extinktion durch Proteine.

▲—▲ $(rC)_n.(dG)_{12-18}$
●—● $(rA)_n.(dT)_{12}$.

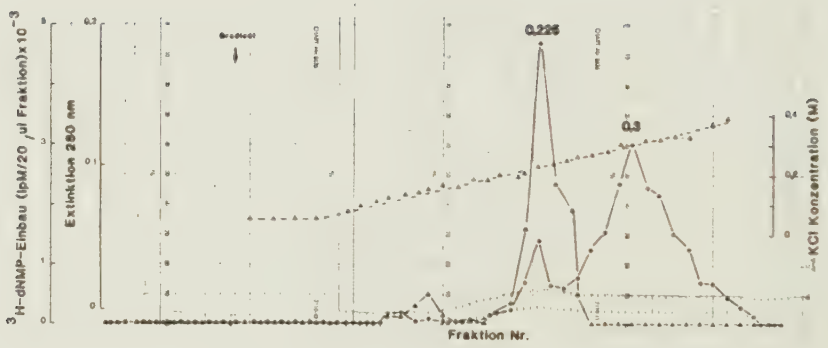


ABBILDUNG 13: AUFTRENNUNG VON REVERSE TRANSKRIPTASE UND DNA-POLYMERASE γ AUF DER PHOSPHOCELLULOSE-SÄULE (P 11) (0,025-0,13M KCL POOL DER DEAE-CELLULOSESÄULE (DE 52)).
Die Einzelheiten des Nachweises der Reverse Transkriptase (0,225 M KCl) und DNA-Polymerase γ (0,3 M KCl) mit Hilfe der DNA-Biosynthese, sind unter Abschnitt 3.8.3. beschrieben.
Abszisse : Fraktionsnummer der eluierten Proben.
Ordinaten: DNA-Polymeraseaktivität,
Konzentration des Gradienten und
UV-Extinktion durch Proteine.

▲—▲ $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$
●—● $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$

diese Annahme (LEWIS et al. 1974; MAYER et al. 1974; ROBERT-GUROFF et al. 1977).
Die Fraktion V zeigte mit der Matrize $(dA)_n.(dT)_{10}$ gar keine Aktivität mehr; sie war demnach völlig frei von DNA-Polymerase β. Die mit $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ bzw. $(rC_m)_n.(dG)_{12-18}$ gemessene Enzymaktivität nahm durch diesen Reinigungsschritt um das 10-fache bzw. 9,5-fache zu, mit $(rA)_n.(dT)_{12}$ jedoch nur um das 4-fache. Auch diese Relation spricht dafür, daß die Polymerase γ abgetrennt wurde.

Man darf also aus folgenden Gründen annehmen, daß die Fraktion V die gesuchte Reverse Transkriptase enthielt:
1) wird die DNA-Polymerase γ bei einer anderen, höheren KCl-Konzentration von der Phosphocellulose eluiert,
2) wurde die Matrize $(dA)_n.(dT)_{10}$ von der Fraktion V nicht mehr transkribiert,
3) sind die drei synthetischen Matrizen, welche von der Fraktion V in hohem Maße transkribiert werden, spezifisch für virale Reverse Transkriptase.

4.1.3. ISOELEKTROFOKUSIERUNG

Die Fraktion V aus dem Pool der Phosphocellulose-Chromatographie (0,17-0,23), welche die Reverse Transkriptase enthielt, wurde in einem linearen Gradienten von 10-60% Glyzerin zwischen pH 3 und pH 9 elektrofokusiert (vergl. Abschnitt 3.7.6.).
Danach hatten sich zwei getrennte Banden mit Reverse Transkriptase-Aktivität gebildet : eine bei pH 6,6 und die zweite bei pH 5,6 (Abb. 14b).In beiden Peaks wurde die Matrize $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ sehr effektiv abgelesen, während $(rA)_n.(dT)_{12}$ von dem Enzym mit IP 6,6 nur geringfügig und von dem Enzym mit IP 5,6 noch schwächer transkribiert wurde. Die Transkription dieser Matrize zeigte sich erst wieder nach der Dialyse der Pools, die aus diesen Fraktionen gewonnen wurden (Tabelle 10). Die Reinigung und Auftrennung in zwei Fraktionen mit verschiedenen isoelektrischen Punkten (Fraktion VII mit IP

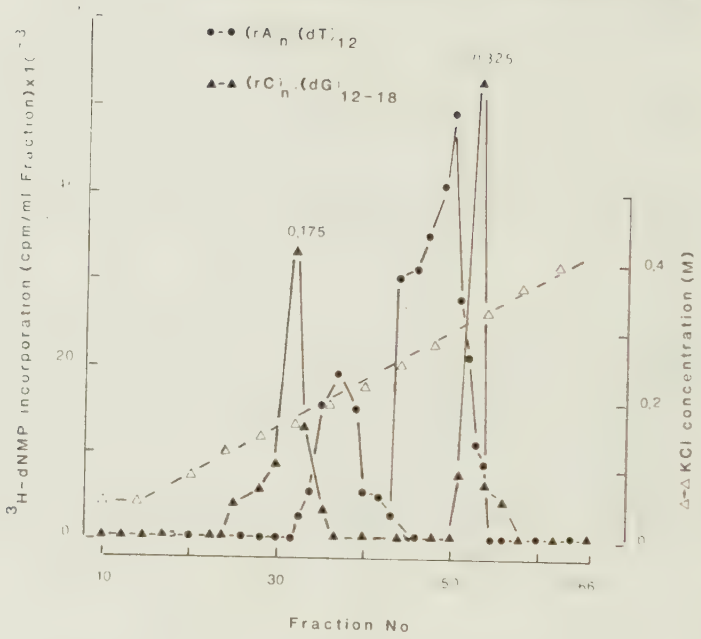


ABBILDUNG 14a: ZWEITE AUFTRENNUNG VON REVERSE TRANSKRIPTASE AUF DER PHOSPHOCELLULOSESÄULE ZUR VERWENDUNG IN DER ISOELEKTRISCHEN FOKUSIERUNG.
Die Einzelheiten des Nachweises der Reverse Transkriptase (0,17-0,23 M KCl) und DNA-Polymerase γ (0,28-0,31 M KCl) mit Hilfe der DNA-Biosynthese, sind unter Abschnitt 3.8.3. beschrieben.
Nach der Dialyse des Reverse Transkriptase-Pools, betrugen die spezifischen Enzymaktivitäten für

$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$	:	54	pMol/30 Min./mg	Protein
$(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$	:	51	" "	"
$(rA)_n \cdot (dT)_{12}$	:	48	" "	"
$(dA)_n \cdot (dT)_{10}$	:	0	" "	"
aktivierte DNA	:	9	" "	"

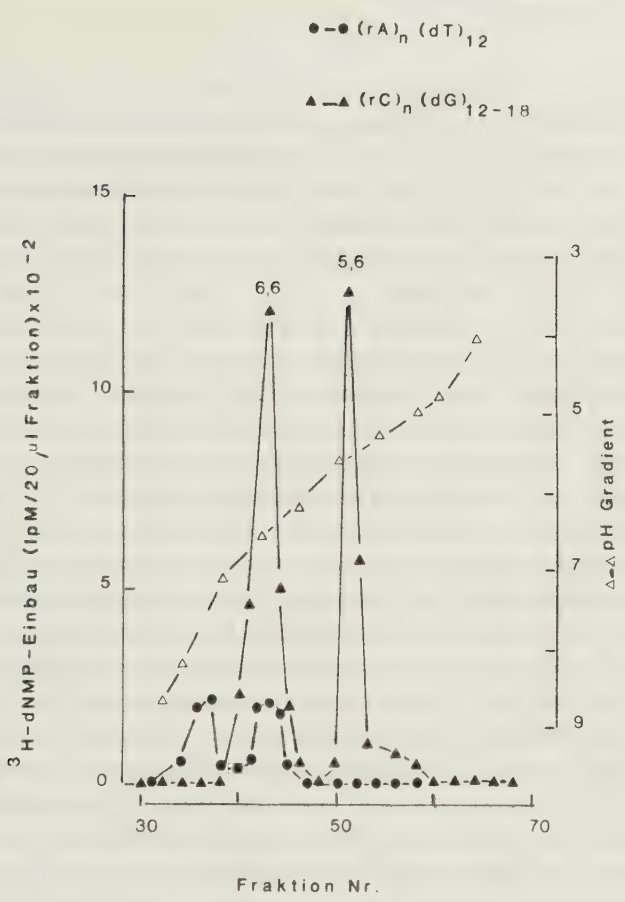


ABBILDUNG 14b: ISOELEKTROFOKUSIERUNG DER REVERSE TRANSKRIPTASE (0,17-0,23 M KCL PHOSPHOCELLULOSE-ELUAT DER ZWEITEN AUFTRENNUNG).
Die Einzelheiten des Nachweises der Reverse Transkriptase-Aktivitäten mit Hilfe der DNA-Biosynthese, sind unter Abschnitt 3.8.3. beschrieben.

6,6 und Fraktion VIII mit IP 5,6) hatte eine weitere Zunahme an spezifischer Enzymaktivität mit der synthetischen Matrize $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ zur Folge. Die genauen Werte der spezifischen Enzymaktivität lassen sich aber für die beiden Fraktionen der IEF nicht angeben, denn die Proteinbestimmung ergab, daß die Proteinmenge, die allein in den beiden Peakfraktionen wiedergefunden wurde, etwa 11-fach höher war, als die für diese Trennung eingesetzte Proteinmenge. Wie ein Kontrollexperiment ergab, war die Bestimmung durch eine aus dem IEF-Medium stammende Komponente gestört worden. Dieser Effekt wurde bereits von BENSADOUN und WEINSTEIN (1976) beschriebe
Um die neuen Reinigungsstufen wenigstens grob mit den vorhergehenden vergleichen zu können, wurde nun angenommen, daß jede der Fraktionen VII und VIII im ungünstigsten Fall die gesamte zur Trennung eingesetzte Proteinmenge enthielt. Berechnet man unter dieser Annahme die spezifischen Enzymaktivitäten der IEF-Fraktionen, so ergeben sich Mindest-Werte, die in Tabelle 10 im Klammern angegeben sind. Die spezifische Enzymaktivität stieg danach für die Fraktion VII (IP 6,6) mit dem Matrize $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ mindestens auf das 1,8-fache und gleichzeitig für die Fraktion VIII (IP 5,6) mindestens auf den 2,1-fachen Wert der vorhergehenden Fraktion V an. Etwa gleich hohe Aktivitätsteigerungen konnten nach dieser Reinigungsstufe auch mit der Matrize $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ in beiden Fraktionen festgestellt wurden. Sie waren für die Fraktion VII (IP 6,6) mindestens 1,4-fach und für die Fraktion VIII (IP 5,6) mindestens 2,3-fach. Obwohl die methylierte Matrize als einzige für virale Reverse Transkriptase hoch spezifisch ist, wird sie doch nur mit geringerer Effektivität transkribiert als $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ (KIESSLING und GAULIAN 1976).

Wie in Fraktion V war die Reverse Transkriptase der beiden Fraktionen VII und VIII mit $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$ nicht aktiv, während "aktivierte DNA" in signifikanter Weise abgelesen wurde.
Die Fraktion VI der Phosphocellulose-Chromatographie (Pool 0,28-0,31 M KCl) wurde nicht elektrofokusiert, weil die biochemische Charakterisierung ergeben hatte, daß sie aus DNA-Polymerase γ bestand.

Wenn man die Abtrennung der Reverse Transkriptase von den anderen Proteinen während der Isolation beurteilen möchte, kann man zunächst in den Diagrammen der drei aufeinanderfolgenden Säulenchromatographien (Abb. 11, 12, 13) das Ausmaß der UV-Extinktion in den Peakbereichen vergleichen. Dabei sind die unterschiedlichen Maßstäbe der Registrierungen zu berücksichtigen.
In den Tabellen 11-13 sind dann die Fraktionen I bis VIII mit ihren Proteingehalten aufgeführt. Wie man sieht war schon in der Fraktion II (Mikrosomales Pellet) eine bedeutende Abnahme eingetreten und mit den anschließenden Trennverfahren wurde eine fortschreitende Eliminierung unspezifischer Proteine erreicht, bis in den beiden Fraktionen (V und VI) aus der Phosphocellulose-Chromatographie nur noch eine sehr geringe Menge enthalten war. Auch die enzymatische Gesamtaktivität der Fraktionen, die mit den drei für Reverse Transkriptase spezifischen Matrizen gemessen wurde, verringerte sich während der Abtrennung der anderen DNA-Polymerasen bis zur Fraktion V auf 0,5-0,9%. Im Gegensatz dazu, nahm die auf den Proteingehalt bezogene, spezifische Aktivität für diese drei Matrizen, wie bereits im Einzelnen beschrieben, bei jedem Reinigungsvorgang zu.
Der jeweils erreichte Reinigungsgrad wurde berechnet, indem die spezifische Aktivität jeder Fraktion auf diejenige des Rohextrakts (Fraktion I) bezogen wurde. Man erhält dadurch einen nützlichen Hinweis auf die Anreicherung der Reverse Transkriptase nach den verschiedenen Reinigungsschritten.
Das Enzym war nach der Kationenaustauscher-Chromatographie entsprechend der $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$-Aktivität 324-fach, mit $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ 394-fach und mit $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ 171-fach angereichert. Nach der Auftrennung mit der IEF war die spezifische Enzymaktivität stark angestiegen und der Reinigungsgrad bezogen auf die Matrize $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ war bei IP 6,6 mindestens 590-fach und bei IP 5,6 mindestens 663-fach. Der weitere Anstieg des Reinigungsgrades war bei den IEF-Fraktionen aber weniger auf die Abtrennung unspezifischer Proteine zurückzuführen, denn bei seiner Berechnung konnte die Abnahme des Proteingehalts als Folge eines Reinigungseffek-

TABELLE 11: GESAMTAKTIVITÄT UND REINIGUNGSGRAD DER DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT WÄHREND DER EINZELNEN REINIGUNSPHASEN MIT Mn^{++}-IONEN UND $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ ALS MATRIZEN-PRIMER

	Fraktion	Einbau von ^{3}H-dGMP in DNA (pMol/30 Minuten/mg Protein)				
		Protein-menge (mg)	Gesamtaktivität (pMol/30 Min.)	Gesamt-aktivität (%)	Spezifische Aktivität (pMol/30 Min./mg Prot.)	Reinigungs-grad
I	Rohextrakt	6900	2702,1	100	0,4	1
II	Mikrosomales Pellet	434,4	1027,2	38	2,4	6
III	DE 23, Pool (0,1-0,25 M KCl)	70,5	448,3	17	6,4	16
IV	DE 52, Pool (0,025-0,13 M KCl)	8,3	101,9	4	12,2	31
V	P 11 (0,225 M KCl)	0,19	24,6	0,9	129,6	324
VI	P 11 (0,3 M KCl)	0,32	20,3	0,8	61,8	159
VII	IEF (IP 6,6)	(max. 0,08)*	18,9	0,7	(min. 236)*	(min. 590)*
VIII	IEF (IP 5,6)	(max. 0,08)*	21,2	0,8	(min. 265)*	(min. 663)*

*(Gesamte in der Trennung eingesetzte Proteinmenge und damit berechnete Werte)

TABELLE 12: GESAMTAKTIVITÄT UND REINIGUNGSGRAD DER DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT WÄHREND DER EINZELNEN REINIGUNGSPHASEN MIT Mn^{++}-IONEN UND $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ ALS MATRIZEN-PRIMER

		Einbau von ^{3}H-dGMP in DNA (pMol/30 Minuten/mg Protein)				
	Fraktion	Protein-menge (mg)	Gesamtaktivität (pMol/30 Min.)	Gesamt-aktivität (%)	Spezifische Aktivität (pMol/30 Min./mg Prot.)	Reinigungs-grad
I	Rohextrakt	6900	1829,79	100	0,27	1
II	Mikrosomales Pellet	434,4	923,23	50	2,13	8
III	DE 23, Pool (0,1-025 M KCl)	70,5	428,94	23	6,08	23
IV	DE 52, Pool (0,025-0,13 M KCl)	8,3	93,31	5	11,20	42
V	P 11 (0,225 M KCl)	0,19	20,2	1,1	106,4	394
VI	P 11 (0,3 M KCl)	0,32	0	0	0	0
VII	IEF (IP 6,6)	(max. 0,08)*	11,8	0,6	(min. 148)*	(min. 546)*
VIII	IEF (IP 5,6)	(max. 0,08)*	19,9	1,1	(min. 249)*	(min. 912)*

*(Gesamte in der Trennung eingesetzte Proteinmenge und damit berechnete Werte)

TABELLE 13: GESAMTAKTIVITÄT UND REINIGUNSGRAD DER DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT WÄHREND DER EINZELNEN REINIGUNGSPHASEN MIT Mg^{++}-IONEN UND $(rA)_n.(dT)_{12}$ ALS MATRIZEN-PRIMER

		Einbau von ^{3}H-dTMP in DNA (pMol/30 Minuten/mg Protein)				
	Fraktion	Protein-menge (mg)	Gesamtaktivität (pMol/30 Min.)	Gesamt-aktivität (%)	Spezifische Aktivität (pMol/30 Min./mg Prot.)	Reinigungs-grad
I	Rohextrakt	6900	3637,66	100	0,53	1
II	Mikrosomales Pellet	434,4	841,54	23	1,94	4
III	DE 23, Pool (0,1-0,25 M KCl)	70,5	455,64	13	6,46	13
IV	DE 52, Pool (0,025-0,13 M KCl)	8,3	185,25	5	22,24	42
V	P 11 (0,225 M KCl)	0,19	17,2	0,5	90,6	171
VI	P 11 (0,3 M KCl)	0,32	260,84	7	795,2	1500
VII	IEF (IP 6,6)	(max. 0,08)*	4,1	0,1	(min. 51)*	(min. 97)*
VIII	IEF (IP 5,6)	(max. 0,08)*	1,5	0,04	(min. 19)*	(min. 35)*

* (Gesamte in der Trennung eingesetzte Proteinmenge und damit berechnete Werte)

tes nicht berücksichtigt werden. Daraus kann man schließen, daß die Enzymaktivität stimuliert worden sein muß. Man erkennt dies auch daran, daß die Werte der Gesamtaktivitäten dieser Fraktionen von 18,9 bzw. 21,2 pMol/30 Min. fast genauso hoch sind wie in der Fraktion V (24,6 pMol/30 Min.), obwohl sie nur auf den Bruchteil der Fraktion V zurückgehen, der für die IEF verwendet wurde.
In der Literatur werden ganz unterschiedliche Reinigungsgrade für Reverse Transkriptase aus Tumoren angegeben, weil dieser Wert u.a. von den verwendeten Reinigungsmethoden und von dem Gehalt an neoplastischen Zellen im Gewebe abhängt. So konnten WITKIN et al. (1975) die Reverse Transkriptase aus Milz (CLL) 56-fach reinigen, SARNGADHARAN et al. (1972) aus Leukämiezellen 220-fach, OHNO et al. (1977) aus Mammatumor 240-fach und EBENER et al. (1979) aus Osteosarkom 371-fach. Besonders hohe Reinigungsgrade für Reverse Transkriptase erreichten CHANDRA und STEEL (1977) bei der Milz eines Myelofibrosepatienten (1000-fach), CHANDRA et al. (1978) bei einem Melanom (1188-fach). Der Reinigungsgrad für DNA-Polymerase γ in der Fraktion VI war entsprechend der Messung mit $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ 1500-fach.

4.1.4. MOLEKULARGEWICHT DER REVERSE TRANSKRIPTASE

Die folgende Charakterisierung der Enzympräparation mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese diente zur Überprüfung ihrer Reinheit und zur Bestimmung des Molekulargewichtes der enthaltenen Komponenten. Die proteinhaltigen Proben von allen Fraktionen wurden mit DTT und 0,2% SDS für 5 Min. auf 100 °C erhitzt, um unter diesen Bedingungen eventuell vorhandene Disulfidbrücken und Peptiduntereinheiten durch Reduktion bzw. Denaturierung aufzuspalten. Die Reverse Transkriptase-haltigen Fraktionen V, VII und VIII waren wegen ihres geringen Proteingehaltes vorher durch Dialyse stark konzentriert worden. Die bei 0,225 M KCl aus der Phosphocellulose-Chromatographie eluierte Reverse Transkriptase-haltige Fraktion V, wanderte bei der elektrophoretischen Analyse als einzelne, anfärbbare, dichte Proteinbande. Die densitometrische Registrierung (Abb. 15) zeigt einen einzigen Peak der sich deutlich vom Hinter-

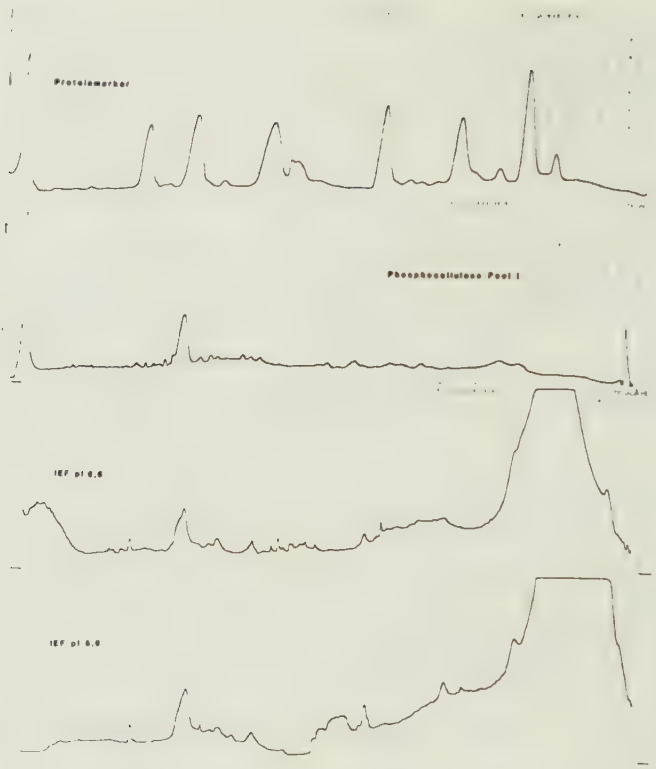


ABBILDUNG 15: SDS-GELELEKTROPHORESE DER ISOLIERTEN REVERSE TRANSKRIPTASE AUS OVARIALKARZINOM.
Die Densitometeraufzeichnungen geben die Laufrichtung der Peptide von links nach rechts wieder. Von oben nach unten sind die Trennungen von Markerproteine und von den Fraktionen V, VII und VIII dargestellt. Die Einzelheiten des Nachweises der Reverse Transkriptase-Trennung sind unter Abschnitt 3.11.1. beschrieben.

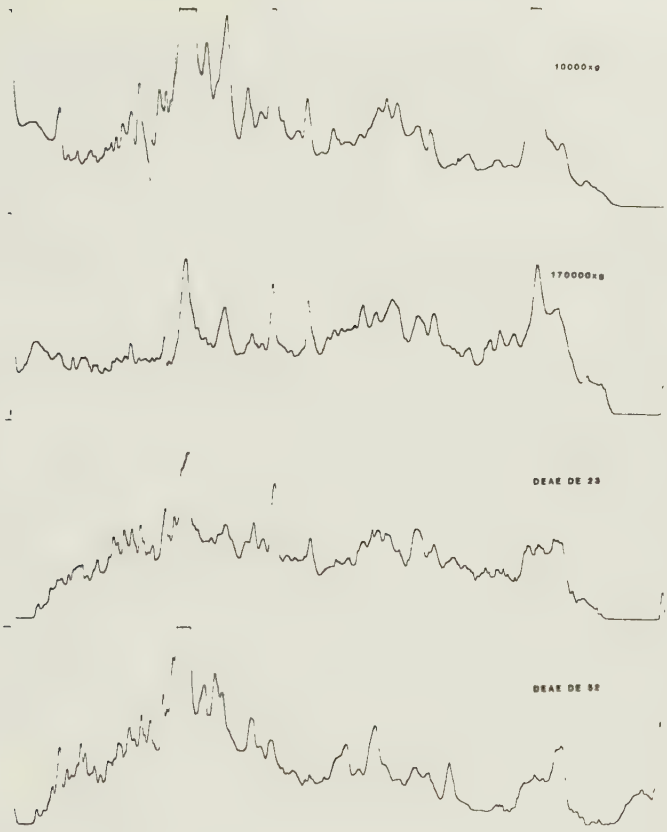


ABBILDUNG 16: SDS-GELELEKTROPHORESE DER VERSCHIEDENEN REINIGUNGSSTUFEN.
Die Densitometeraufzeichnungen geben die Laufrichtung der Peptide von links nach rechts wieder. Von oben nach unten sind die Trennungen der Fraktionen I-IV dargestellt. Die Einzelheiten des Nachweises der Reverse Transkriptase-Trennung sind unter Abschnitt 3.11.1. beschrieben.

grund abhebt. Die Bestätigung dieses Ergebnisses wurde durch die elektrophoretische Wanderung der zwei IEF-Fraktionen (VII und VIII) erhalten, die aus der gleichen Phosphocellulose-Fraktion abgetrennt worden waren. Die beiden IEF-Fraktionen, von IP 6,6 und IP 5,6 lieferten je eine einzige Proteinbande mit fast der gleichen elektrophoretischen Beweglichkeit wie Fraktion V. Der Anstieg der optischen Dichte am Ende der Registrierung bei den beiden IEF-Proben ist kein Widerspruch zur elektrophoretischen Reinheit der Enzympräparationen. Nach der Entfärbung blieb am unteren Ende des Gels ein ausgedehnter Farbfleck unbekannter Herkunft zurück, der homogen und frei von Banden war und bis zu dem die Proteine der Trennung nicht vorgedrungen waren. Vergleicht man das Trennergebnis bei der Phosphocellulose-Fraktion (V) mit dem von den vorhergehenden Fraktionen (Abb. 16), so erkennt man, daß die Reverse Transkriptase dort zusammen mit anderen Proteinen von ähnlichem Molekulargewicht in einem großen Peak enthalten sein muß, der von unzähligen Banden weiterer, unspezifischer Proteine umgeben ist. Ein quantitativer Vergleich zwischen den Fraktion ist hier nicht möglich, weil die Größe der registrierten Enzympeaks von der Einstellung des Densitometers abhängt.

Parallel zu den Fraktionen wurde bei der SDS-Gelelektrophorese auch ein Gemisch von Markerproteinen mit bekannten Molekulargewichten getrennt, die in der gleichen Weise vorbehandelt wurden. Es handelte sich um Phosphorylase b (94.000), Rinderserumalbumin (67.000), Ovalbumin (43.000), Carbonanhydrase (30.000), Tripsininhibitor (20.100) und α-Lactalbumin (14.400). Aus der Migration dieser Proteine wurde eine Eichkurve konstruiert, in die man die Wanderstrecken der gereinigten Reverse Transkriptase-Fraktionen einordnen kann, um ihr Molekulargewicht abzuschätzen (Abb. 17). Das Enzym der Phosphocellulose-Fraktion (V) hat ein Molekulargewicht von etwa 70.800 und die Migration der beiden IEF-Fraktionen (VII, VIII) entspricht 68.400.

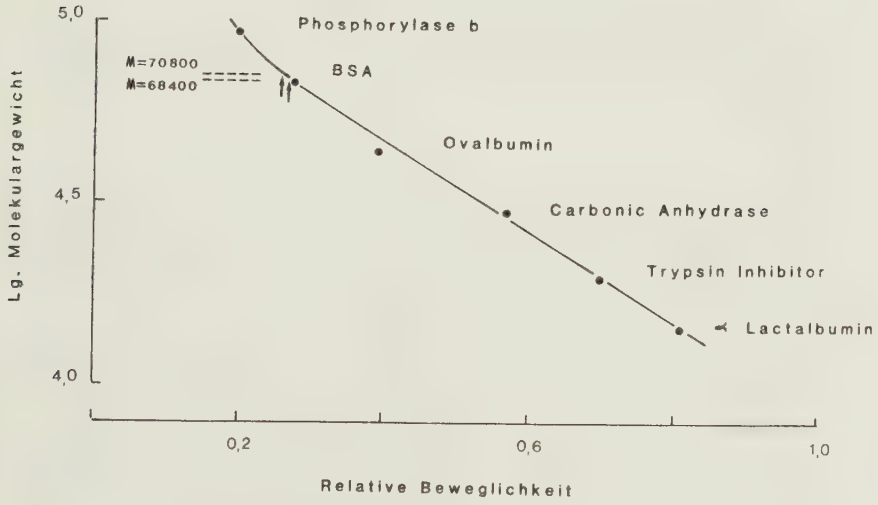


ABBILDUNG 17: MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG DER GEREINIGTEN REVERSE TRANSKRIPTASE AUS DEM OVARIALKARZINOM. Die Einzelheiten dieser Untersuchung sind unter Abschnitt 3.11.1. beschrieben.

4.2. BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER REVERSE TRANSKRIPTASE AUS OVARIALKARZINOM

Die Fraktion V, welche die gereinigte Reverse Transkriptase enthielt, wurde in verschiedenen Experimenten untersucht, um ihre biochemischen Eigenschaften festzustellen. Bei dem ersten Test (Tabelle 10) zeigte sich schon die Bevorzugung bestimmter Matrizen-Primer im Unterschied zu den zellulären Polymerasen.

Die Reverse Transkriptase-haltige Poolfraktion (V) wurde nun weiter daraufhin untersucht, ob sie Terminal-Desoxyribonukleotidyl-Transferase (TdT) enthält. Dieses Enzym wurde erstmalig von BOLLUM (1960) entdeckt und es gilt als biochemischer Marker für bestimmte Leukämiearten. Einerseits wäre es interessant zu wissen, ob Beziehungen zwischen Reverse Transkriptase und TdT-Aktivität bestehen, andererseits könnte die Anwesenheit dieses Enzyms in der Reverse Transkriptase-Präparation die biochemische Charakterisierung der Reverse Transkriptase stören. Die TdT katalysiert nämlich die DNA-Synthese allein in Anwesenheit eines Primers, ohne auf eine Matrize angewiesen zu sein.
Wie aus Tabelle 14 hervorgeht, waren verschiedene Primer wie Oligo$(dG)_{12-18}$, Oligo$(dT)_{12-18}$ und vor allem Poly$(dA)_n$ nicht in der Lage die Fraktion V zur DNA-Synthese zu stimulieren, wodurch die Abwesenheit von TdT-Aktivität angezeigt wurde.

Die Beeinflußbarkeit des Enzyms durch ein- und zweiwertige Metallionen stellt ein weiteres wichtiges Kennzeichen dar. In Gegenwart von Mn^{++}-Ionen im Konzentrationsbereich von 0,1-1,2 mM zeigte die Enzymaktivität eine typische Abhängigkeit von der Ionenkonzentration und erreichte mit der Matrize $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ bei 0,8 mM ihren höchsten Wert (Abb. 18). Mit $(rA)_n.(dT)_{12}$ (Abb. 19) lag das Optimum dagegen bei einer Mn^{++}-Ionenkonzentration von 0,6-0,8 mM und unterhalb des Werts von Abb. 18. Vergleichbare Werte sind schon von früheren Arbeiten über menschliche Tumoren bekannt. Mit $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ war die von EBENER et al. (1979) gefundene Reverse Transkrip-

TABELLE 14: UNTERSUCHUNG DER GEREINIGTEN REVERSE TRANKRIPTASE AUF TERMINALTRANSFERASE-AKTIVITÄT

Matrize-Primer oder Primer	Substrat	Einbau von ^{3}H-dGMP in DNA (pMol/mg Protein)
$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$	^{3}H-dGMP dCTP/dGTP	129,6
Poly(dA)	^{3}H-dGMP dGTP	0
$Oligo(dG)_{12-18}$	^{3}H-dGMP dATP/dTTP/dCTP	0
$Oligo(dT)_{12-18}$	^{3}H-dGMP dATP/dTTP/dCTP	0

Die Einzelheiten der Reaktion sind unter Abschnitt 3.9.5. beschrieben.

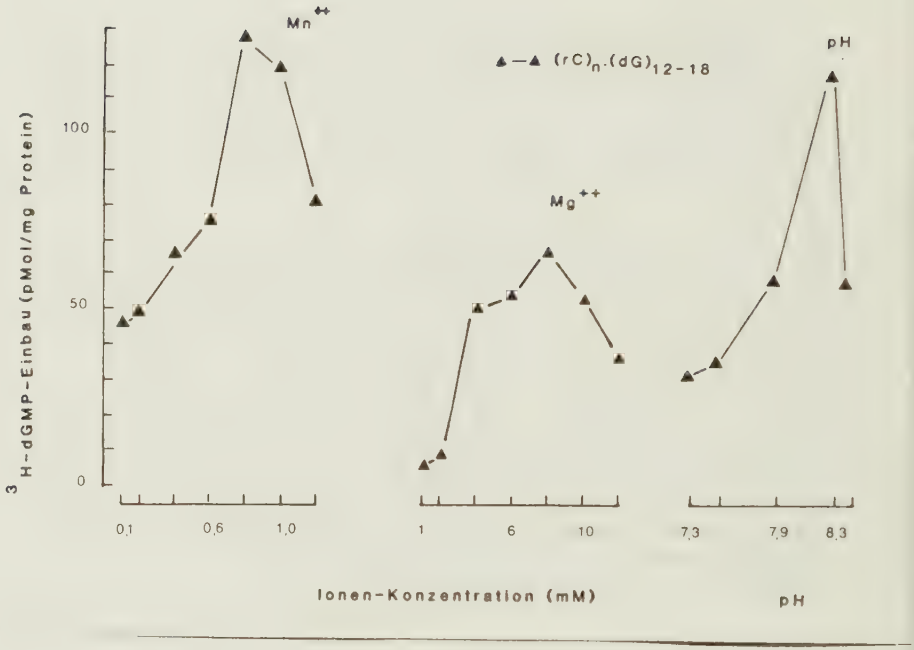


ABBILDUNG 18: EINFLUSS VERSCHIEDENER METALLIONEN-KONZENTRATIONEN UND DER WASSERSTOFFIONEN-KONZENTRATION AUF DIE REVERSE TRANSKRIPTASE-AKTIVITÄT.
Die Einzelheiten dieser Untersuchungen sind unter Abschnitt 3.9.1. und 3.9.2. beschrieben.

tase bei der Mn^{++}-Konzentration von 1,0 mM am aktivsten. CHANDRA et al. (1978) beobachteten 0,6 mM, CHANDRA und STEEL (1977) 0,8-1,0 mM und GILLESPIE et al. (1975) 1,0 mM. Gleichzeitig wurde der Einfluß von Mg^{++}-Ionen untersucht. Bei der $(rC)_n.(dG)_{12-18}$-abhängigen Reaktion wurde im Bereich von 1-12 mM eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit erhalten. Bei 1-2 mM Mg^{++} war das Enzym praktisch inaktiviert und zeigte bei 8 mM das Aktivitätsmaximum. Die Transkription von $(rA)_n.(dT)_{12}$ (Abb. 19) stieg von niedrigen nach hohen Mg^{++}-Konzentrationen an und erreichte bei 10 bis 12 mM die höchsten Werte. Die in der Literatur aufgeführten Werte reichen von 5 bis 12 mM (SARNGADHARAN et al. 1972; WITKIN et al. 1975; CHANDRA und STEEL 1977).
Zusammen betrachtet bevorzugte die Reverse Transkriptase in der $(rA)_n.(dT)_{12}$-abhängigen Reaktion Mg^{++}-Ionen und mit der Matrize $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ die Mn^{++}-Ionen, wobei die Aktivität in der zuletzt genannten Reaktion 41% höher war. Der Bedarf an bivalenten Ionen hängt von der Art des Template-Primers und von der Herkunft der Reverse Transkriptase ab. Anhand der Tabelle 2 wurde bereits darauf hingewiesen, daß ein Reihe von Reverse Transkriptasen aus menschlichen Tumoren mit der Kombination von Mn^{++}-Ionen und der Matrize $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ ihre größte Aktivität entfalten. Die Einwirkung von K^+-Ionen zwischen 20-120 mM auf die Fraktion V führte zu einem Maximum bei 60 mM bei der Transkription von $(rA)_n.(dT)_{12}$ (Abb. 19). Die Beeinflußbarkeit des Enzyms durch diese einwertigen Kationen war aber geringer als bei der Mg^{++}-stimulierten Reaktion und ergab nur etwas mehr als halbe Reaktionsgeschwindigkeit.
Zur Feststellung des pH-Optimums wurde die katalytische Aktivität zwischen pH 7,3 und 8,5 gemessen. Es lag für diese in vitro Reaktion der Reverse Transkriptase und in Gegenwart der optimalen Mn^{++}-Konzentration sowie des Matrizen-Primers $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ zwischen pH 8,2 und pH 8,3. Dieser für DNA-Polymerasen relativ hohe Wert steht im Einklang mit Ergebnissen die von anderen Reverse Transkriptasen aus menschlichen Tumoren gewonnen wurden wie pH 8,1 (EBENER et al. 1979), pH 8,0 (CHANDRA et al. 1978), pH 8,0 (OHNO et

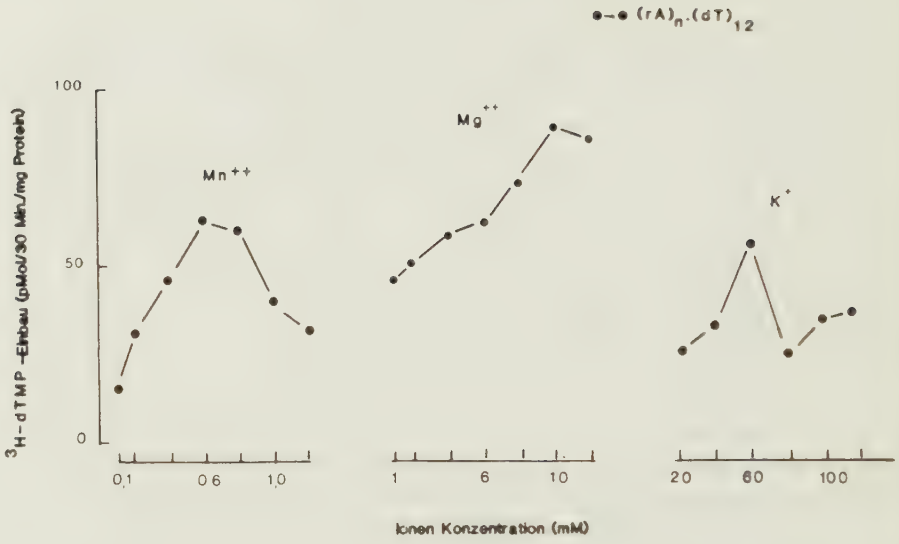


ABBILDUNG 19: EINFLUSS VERSCHIEDENER METALLIONEN-KONZENTRATIONEN AUF DIE REVERSE TRANSKRIPTASE-AKTIVITÄT. Die Einzelheiten dieser Untersuchungen sind unter Abschnitt 3.9.1. beschrieben.

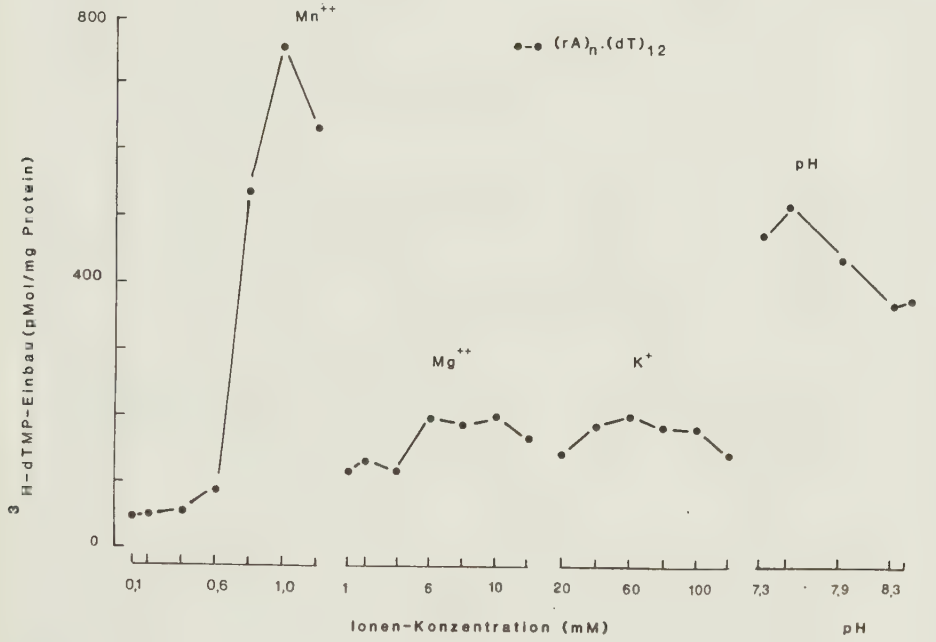


ABBILDUNG 20: EINFLUSS VERSCHIEDENER METALLIONEN-KONZENTRATIONEN UND PH-ABHÄNGIGKEIT AUF DIE γ-DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT.
Die Einzelheiten dieser Untersuchungen sind unter Abschnitt 3.9.1. und 3.9.2. beschrieben.

et al. 1977). CHANDRA und STEEL (1977) beobachteten pH 7,5, wobei die Aktivität ihres Enzyms zwischen pH 7,2 und 8,2 fast gleich war.

Auch die Fraktion VI aus der Phosphocellulose-Chromatographie wurde in dieser Weise biochemisch charakterisiert, um die Annahme zu überprüfen, daß sie aus DNA-Polymerase γ bestand. Die Analysen mit verschiedenen Matrizen-Primern (Tabelle 10) wurden bereits kommentiert. Wie man in Abb. 20 erkennen kann, wurde diese Enzymaktivität durch Mn^{++}-Ionen äußerst stark stimuliert. Das Maximum lag in einem eng ungrenzten Konzentrationsbereich bei 1,0 mM. Dieser Wert liegt unerwartet hoch. Bei früheren Untersuchungen wurde die DNA-Polymerase γ durch das Aktivitätsmaximum bei Mn^{++}-Konzentrationen von 0,2-0,5 mM gekennzeichnet (MATSUKAGE et al. 1975; KNOPF et al. 1976; ROBERT-GUROFF et al. 1977; CHANDRA et al. 1981).
In Gegenwart von Mg^{++}-Ionen, verlief die Enzymreaktion zwischen 6 und 12 mM fast gleichmäßig und die maximale spezifische Aktivität betrug nur 25% im Vergleich zur Reaktion mit Mn^{++}. Diese geringe Stimulierbarkeit durch Mg^{++}-Ionen wurden bereits von ROBERT-GUROFF et al. (1977) und von KNOPF et al. (1976) beschrieben. Sie berichten auch, daß die maximale Aktivität der DNA-Polymerase γ mit Mn^{++}-Ionen dreimal so hoch war wie mit Mg^{++}-Ionen.
Der Effekt von einwertigen K^{+}-Ionen auf diese DNA-Polymerase ähnelte sehr dem von Mg^{++}-Ionen. Er war von 40 bis 100 mM praktisch konstant. Der Einfluß dieses Ions wurde von mehreren Autoren untersucht und sie geben optimale Konzentrationen von 100 bis 120 mM KCl an (BERTAZZONI et al. 1977; SARNGADHARAN et al. 1978).
Als pH-Optimum wurde pH 7,4 bestimmt, von diesem Ergebnis berichten auch MATSUKAGE et al. (1975), ROBERT-GUROFF et al. (1977) und SARNGADHARAN et al. (1978).

Die Wirkung von Phosphationen auf die Enzymaktivität der Fraktion V wurde zwischen 5 und 67 mM untersucht. Wie Abb. 21 zeigt, ergab sich in diesem Bereich eine starke Konzentra-

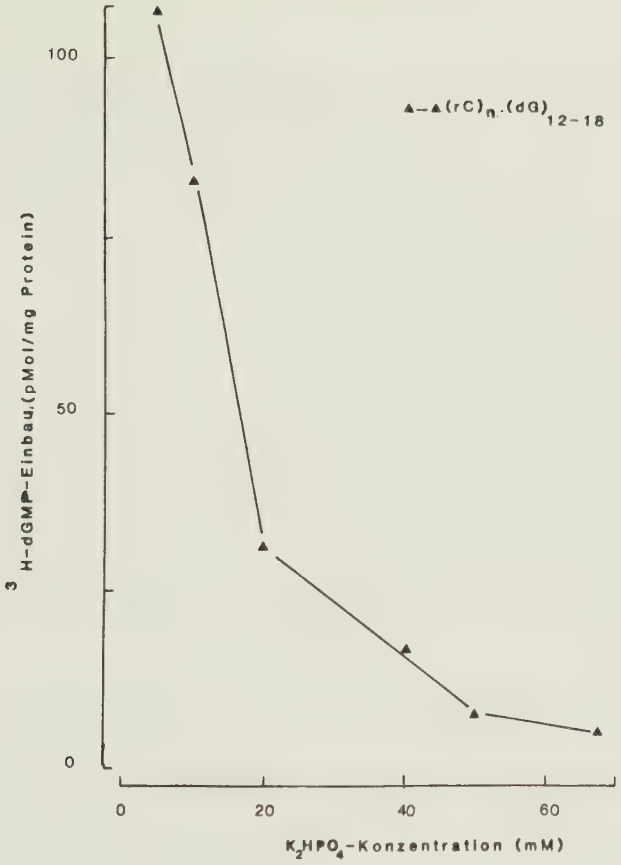


ABBILDUNG 21: EINFLUSS VON HYDROGENPHOSPHATIONEN AUF DIE REVERSE TRANSKRIPTASE-AKTIVITÄT.
Die Einzelheiten dieser Untersuchung sind unter Abschnitt 3.9.1. beschrieben.

tionsabhängigkeit in Form einer ausgeprägten Hemmkurve. Oberhalb von 40 mM K_2HPO_4 wurde die reverse Transkription fast vollständig blockiert. Über das Verhalten der Enzymaktivität in Gegenwart kleinster Phosphat-Konzentrationen kann allerdings keine Aussage gemacht werden, da der Einfluß der Phosphationen unterhalb von 5 mM bei diesem Experiment nicht untersucht wurde.
Die Reverse Transkriptasen einer Reihe von C-Typ Viren der Säuger werden schon durch sehr kleine Phosphatkonzentrationen (1-5 mM) an der DNA-Synthese gehemmt. Dieser Effekt konnte bei den Reverse Transkriptasen aus B-Typ Viren und D-Typ Viren sowie aus AMV nicht beobachtet werden. Auch die zellulären DNA-Polymerasen α und γ werden durch anorganisches Phosphat vergleichsweise wenig gehemmt. Bei der Reverse Transkriptase aus RLV ist diese Hemmung kompetitiver Natur und bei Verwendung der Matrize $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ durch hohe dTTP-Konzentrationen aufhebbar (MODAK und MARCUS 1977).

Das beste biochemische Kriterium, die Anwesenheit von viraler Reverse Transkriptase in einer Enzympräparation nachzuweisen, besteht darin ihre Fähigkeit zu prüfen, die heteropolymere Sequenz von natürlicher, viraler RNA zu transkribieren. Dazu wurde 70 S RNA von AMV verwendet, die aus tierischem Gewebe isoliert worden war. Es ist bekannt, daß viele der bisher aus tierischen Geweben isolierten Reverse Transkriptasen nicht darauf spezialisiert sind, die arteigene 70 S RNA zu transkribieren. Einige können mit heterologer 70 S RNA sogar eine größere Aktivität entfalten (SPIEGELMAN et al. 1971; ABRELL et al. 1973; VERMA et al. 1974b).
Die Ergebnisse der Transkription von exogener 70 S RNA aus AMV sind in Tabelle 15 dargestellt. Während der Reaktion wurden die optimalen Mn^{++}-Konzentrazion und die vier Desoxyribonukleotidtriphosphate verwendet, von denen entweder ^{3}H-dGTP oder ^{3}H-dTTP radioaktiv markiert waren. In Gegenwart von 70 S RNA alleine zeigte die Fraktion V nur einen schwachen ^{3}H-dNMP-Einbau, in beiden Fällen war aber die Fähigkeit der Reverse Transkriptase zur Transkription des hochmolekularen Virusgenoms doch festzustellen. Hier ist der

TABELLE 15: TRANSKRIPTION DER HETEROPOLYMEREN REGIONEN VON 70 S RNA AUS AMV DURCH DIE REVERSE TRANSKRIPTASE AUS OVARIALKARZINOM

Fraktion	Matrizen-Primer	Einbau von ^{3}H-dNMP in DNA (pMol/mg Protein)	
		^{3}H-dGMP	^{3}H-dTMP
P 11, Pool (0,17-0,23 M KCl)* (fraktion V)	70 S RNA	4,0	9,8
	70 S RNA + $p(dT)_{12-18}$	30	26,3
	$p(dT)_{12-18}$	0	0
P 11, Pool (0,26-0,33 M KCl)* (Fraktion VI)	70 S RNA	0	15
	70 S RNA + $p(dT)_{12-18}$	0	20,4
	$p(dT)_{12-18}$	0	0

*Bei diesen Untersuchungen wurde eine andere Charge der Reverse Transkriptase verwendet, die nach dem gleichen Verfahren aus Ovarialkarzinom gereingt wurde.

Die Einzelheiten der Reaktion sind unter Abschnitt 3.9.4. beschrieben.

Vergleich mit einem viralen Enzym interessant. Wie FARAS et al. (1972) angeben, erreichte die Reverse Transkriptase aus RSV mit der arteigenen 70 S RNA nur etwa den vierten Teil der Enzymaktivität im Vergleich zur Reaktion mit $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ und nur die Hälfte der Aktivität, die mit beschallter Kalbthymus DNA festzustellen war. Obwohl also virale RNA die Matrize mit der größten Spezifität für virale Reverse Transkriptase darstellt, so erhält man mit ihr doch eine niedrigere Enzymaktivität als mit den synthetischen Matrizen-Primern. Es konnte aber, wie die Tabelle 15 zeigt, durch Zugabe von Oligo $p(dT)_{12-18}$ eine ganz erhebliche Steigerung der Enzymaktivität erzielt werden. Mit Oligo $p(dT)_{12-18}$ allein beobachtete man dagegen überhaupt keinen ^{3}H-dNMP-Einbau in Nukleinsäuren. Man kann daher annehmen, daß dieses synthetische Oligonukleotid bei der Reaktion mit 70 S RNA den Beginn der DNA-Synthese als Starter gefördert hat.
Die Fraktion VI, welche höchstwahrscheinlich DNA-Polymerase γ enthielt, wurde genauso untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, daß DNA-Polymerase γ wie auch die anderen zellulären Polymerasen kaum in der Lage ist, die heteropolymeren Bereiche der 70 S RNA zu transkribieren. Jedoch kann die DNA-Polymerase γ den Poly(A)-Anteil kopieren, besonders wenn Oligo $p(dT)_{12-18}$ als Starter im Reaktionsgemisch enthalten ist (LEWIS et al. 1974; SPADARI und WEISSBACH 1974; MATSUKAGE et al. 1975; KNOPF et al. 1976; ROBERT-GUROFF et al. 1977). Auch diese Ergebnisse sind in Tabelle 15 aufgeführt. ^{3}H-dGTP konnte mit 70 S RNA allein nicht in Transkripte eingebaut werden. Nur der ^{3}H-dTTP-Einbau war möglich: er wurde stimuliert, indem zu der 70 S RNA-Matrize der Starter Oligo $p(dT)_{12-18}$ dazugegeben wurde. Dies bedeutet, daß nur Poly(A)-Sequenzen transkribiert wurden, aber keine heteropolymeren Bereiche.
Wenn man die ^{3}H-dTMP-Einbauraten zwischen den Fraktionen V und VI direkt vergleichen möchte, muß man berücksichtigen, daß die Enzymaktivität in der Fraktion VI viel höher ist (vergl. Tabelle 10 für "aktivierte DNA" und Tabelle 13 für $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$).

Als letzte Eigenschaft sollte die thermische Beständigkeit der isolierten Reverse Transkriptase und der DNA-Polymerase γ untersucht werden. Anlaß dazu gab der in den Tabellen 11 - 13 berechnete Verlust an Gesamtaktivität bis auf 0,5-1,1%, während der Reinigung. Außerdem hatte die Enzymaktivität auch in der Fraktion V während der Charakterisierungsexperimente weiter abgenommen.
Die beiden Enzymfraktionen wurden getrennt bei 45 °C inkubiert und nach bestimmten Zeiten wurde mit entnommenen Proben die normale standardisierte Enzymreaktion durchgeführt. Die in der Abb. 22 dargestellte Kinetik zeigt, daß die thermische Stabilität bei Fraktion V so gering war, daß schon nach etwa 4 Minuten eine Inaktivierung von 50% eingetreten war.
Über verschiedene Reverse Transkriptasen, die aus Retroviren von Tieren isoliert wurden, liegen bereits Kinetiken zur thermischen Stabilität vor. VERMA et al. (1974a) bestimmten für die Reverse Transkriptase aus RSV die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) bei 44 °C zu 11,5 Minuten. PANET et al. (1975) beobachteten, daß die beiden Reverse Transkriptase -Formen aus AMV bei 46 °C verschiedene thermische Stabilitäten hatten: die $t_{1/2}$-Werte betrugen 15,5 Minuten für das vollständige Enzym (αβ) und 7,5 Minuten für die Untereinheit β. Die Reverse Transkriptasen der Mäusen Viren hatten fast identische $t_{1/2}$-Werte: 6,5 Minuten bei Mo-MuLV und 6 Minuten bei RLV (VERMA 1975; TRONICK et al. 1975).
VOGEL und CHANDRA (1981) haben vor kurzem Reverse Transkriptasen aus menschlichem Plazentagewebe beschrieben, die $t_{1/2}$-Werte von 30 Minuten bzw. 4 Minuten und 40 Minuten mit zwei verschiedenen Matrizen aufwiesen.
Im Gegensatz zur Fraktion V ergab sich für die DNA-Polymerase γ aus Fraktion VI ein Wert von etwa 13 Minuten (Abb. 22). Nach DUBE et al. (1979) besitzen die DNA -Polymerasen der Zellen verschiedene thermische Stabilitäten: die mitochondriale DNA-Polymerase, die sehr ähnliche Eigenschaften wie die DNA-Polymerase γ besitzt, hatte als $t_{1/2}$-Wert um 6 Minuten; die DNA-Polymerase β aus verschiedenen Geweben um

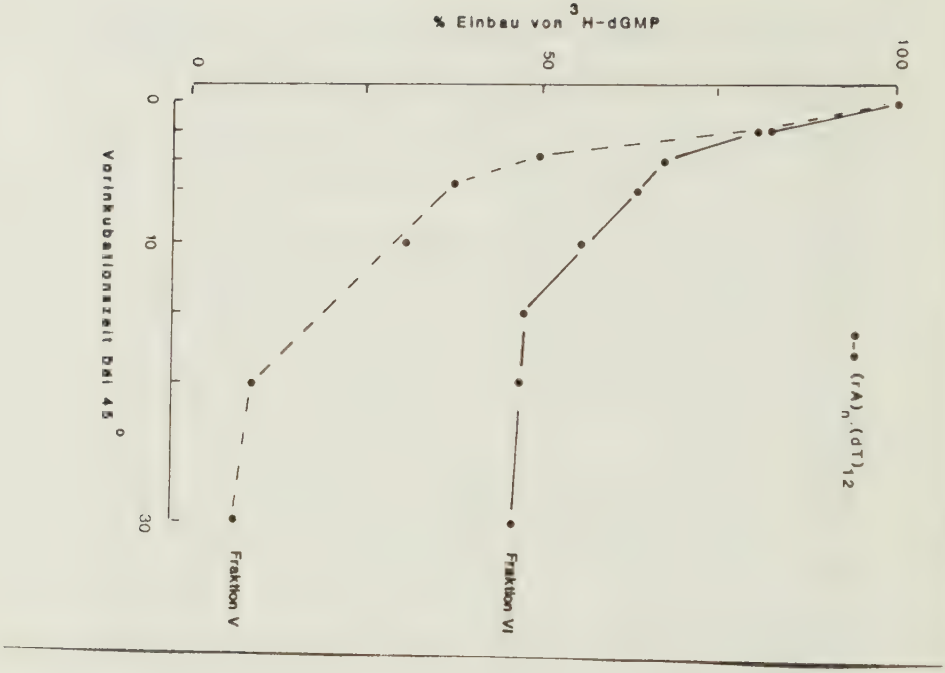


ABBILDUNG 22: THERMOLABILITÄT DER REVERSE TRANSKRIPTASE-AKTIVITÄT UND DER γ-DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT. Die Einzelheiten dieser Untersuchungen sind unter Abschnitt 3.9.6. beschrieben.

3-8 Min. und die DNA-Polymerase α war sehr stabil.

4.3. IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER REVERSE TRANSKRIPTASE

Die aus Ovarialkarzinom isolierte Reverse Transkriptase wurde serologisch untersucht, um festzustellen, ob eine immunologische Beziehung zwischen ihr und den Reverse Transkriptasen der Retroviren von Tieren besteht. Abb. 23 zeigt den Effekt von Antikörpern (Ig G) gegen die DNA-Polymerasen von SiSV, RD 114, FeLV, GaLV und RLV auf die Aktivität der hier isolierten Reverse Transkriptase . Als Bezugswert (100%) wurde die Enzymaktivität in Gegenwart von Serum verwendet, welches vor der Immunisierung durch die viralen Reverse Transkriptasen aus den Spendertieren entnommen wurde. In Gegenwart von $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ und der optimalen Konzentration an K^+ und Mn^+, wurde die Enzymaktivität durch keines der zur Verfügung stehenden Antiseren signifikant gehemmt. Nur bei einer Konzentration von 54 µg verringerten die Antikörper gegen Reverse Transkriptase aus RLV die Enzymaktivität um 35%. Das Ausbleiben einer deutlichen Kreuzreaktion bedeutet, daß die neue Reverse Transkriptase keine enge verwandtschaftliche Beziehung zu den in Frage kommenden viralen DNA-Polymerasen aufweist.

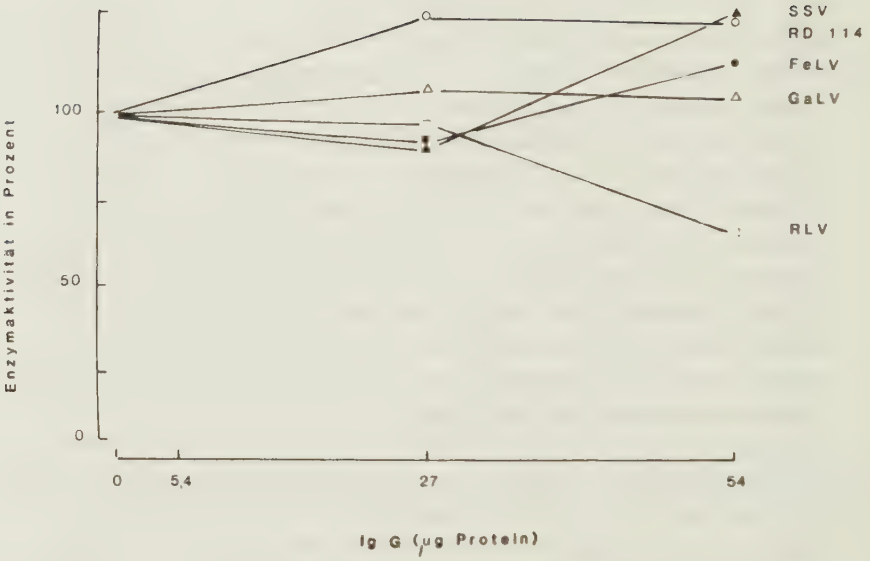


ABBILDUNG 23: WIRKUNG VON IgG GEGEN REVERSE TRANSKRIPTASEN VERSCHIEDENER HERKUNFT AUF DIE REVERSE TRANSKRIPTASE-AKTIVITÄT DES MENSCHLICHEN OVARIAL-KARZINOMS.
Die Einzelheiten dieser Untersuchungen sind unter Abschnitt 3.10. beschrieben.
Verwendete Matrize: $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$
Kontrollwerte: Enzymaktivitäten in Gegenwart von präimmun-IgG (Kontrolle=100%).

4.4. REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER REVERSE TRANSKRIPTASE AUS EINEM MAMMAKARZINOM

Eine Reverse Transkriptase aus menschlichem Mammakarzinom wurde bereits von OHNO und SPIEGELMAN (1977) gereinigt und immunologisch charakterisiert. Sie stellten fest, daß das Enzym mit der Reverse Transkriptase aus MPV (Mason-Pfizer-Mamma Virus) serologisch verwandt war. Es besteht aber nicht nur der serologische Unterschied zu den Reverse Transkriptasen der C-Typ Viren. Darüberhinaus unterschied sich das Enzym aus Mammakarzinom, genauso wie die Reverse Transkriptase aus MPV, auch in der Matrizenspezifität und in der Ionenabhängigkeit von den Reverse Transkriptasen der C-Typ Viren (OHNO et al. 1977; COLCHER und SCHLOM 1980; vergl. auch Tabellen 1 und 2).
Dieses Enzym sollte nur mit der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom vergleichen werden, denn nach den biochemischen Eigenschaften ist zu vermuten, daß die Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom den Enzymen der C-Typ Viren ähnelt. Andererseits konnte mit keinem der Antikörper gegen Reverse Transkriptase aus C-Typ Viren eine Kreuzreaktion beobachtet werden. So war dieser Vergleich wichtig, um die Behauptung zu untermauern, das es sich bei dem Enzym aus Ovarialkarzinom um eine Reverse Transkriptase des C-Typs handelt.

Die zur Reinigung der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom benutzte Methode wurde auch beim Mammakarzinom wieder angewendet (Abb. 24). Dabei wurde allerdings der Reinigungsschritt mit der DEAE-Cellulose-Chromatographie (DE 23) übersprungen, um das Verfahren in anbetracht der Instabilität der Reverse Transkriptase-Aktivität abzukürzen. Während der einzelnen Phasen des Verfahrens wurden die DNA-Polymeraseaktivitätten wieder mit den spezifischen Matrizen-Primern und günstigen Konzentrationen an zweiwertigen Kationen gemessen (Abschnitt 3.8.3., Tabellen 4-7).

Der Rohextrakt (Fraktion I) zeigte mit der synthetischen

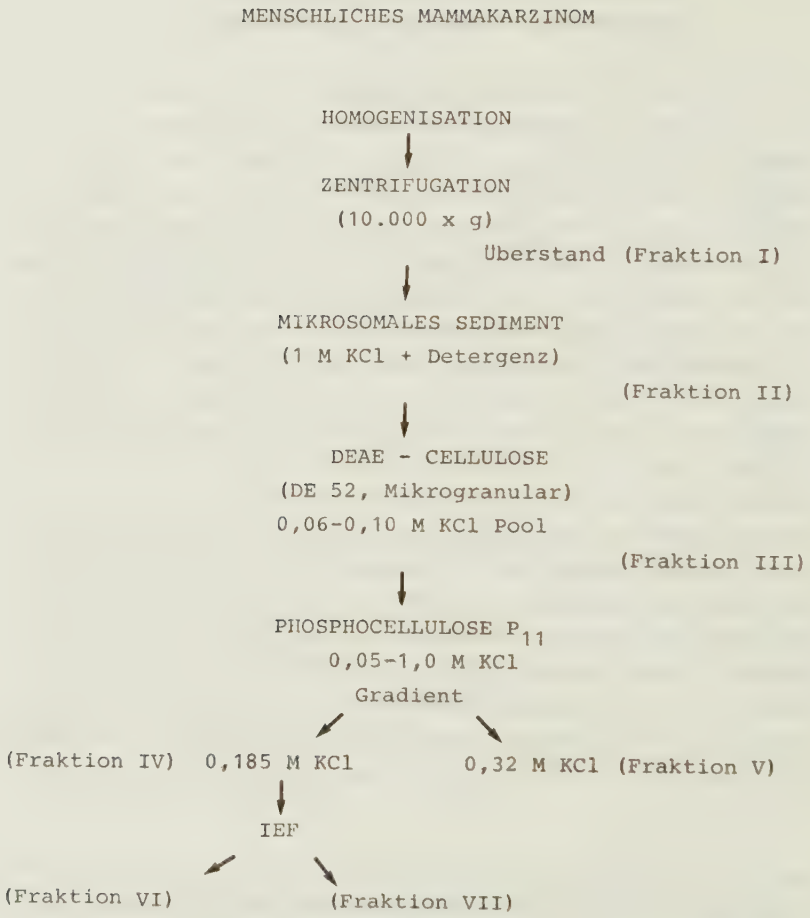


ABBILDUNG 24: SCHEMA ZUR REINIGUNG DER REVERSE TRANSKRIPTASE AUS EINEM MAMMAKARZINOM.

Matrize $(dA)_n.(dT)_{10}$ die größe Aktivität (Tabelle 16). Aber auch alle anderen Matrizen wurden von den in dieser Fraktion enthaltenen DNA-Polymerasen gut transkribiert. Die endogene Enzymaktivität (Werte in Klammern), welche ohne Zugabe einer exogenen Matrize gefunden wurde, zeigt die Anwesenheit der Nukleinsäuren in dem Rohextrakt an. Die im Vergleich dazu höhere DNA-Synthese mit $(rC_m)_n.(dG)_{12-18}$ gibt einen ersten Hinweis auf darauf, daß Reverse Transkriptase enthalten sein könnte.

In der Fraktion des mikrosomalen Pellets (II) wurde durch die Anreicherung der DNA-Polymerasen mit allen Matrizen-Primern eine Erhöhung der Enzymaktivität gemessen (Tabelle 16). Besonders "aktivierte DNA" wurde im Verhältnis zur vorheri - gen Fraktion fast 12 mal so gut abgelesen. Auch die für DNA-Polymerase β, γ und Reverse Transkriptase spezifischen Matrizen ergaben einen Anstieg, und zwar 4,7-fach für $(dA)_n.(dT)_{10}$ und für die anderen Matrizen etwa 3-fach. Die endogene Aktivität dieser Fraktion stieg auf das 5,7-fache und war damit sogar höher als die für Reverse Transkriptase spezifische Transkription in Gegenwart der Matrizen $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ und $(rC_m)_n.(dG)_{12-18}$.

Als erste Chromatographiesäule zur Veringerung des Gehalts an Nukleinsäuren und unspezifischen Proteinen diente DEAE-Cellulose DE 52 (Abb. 25). Die DNA-Polymeraseaktivitäten wurden mit einem linearen KCl-Gradienten von 0,01-0,50 M eluiert. Bei 0,07 und 0,09 M KCl traten Enzympeaks auf, die in einem Pool vereinigt und dialysiert wurden und die Fraktion III bildeten.
Wie der Test auf die verschiedenen zellulären DNA-Polymerasen zeigte (vergl. Tabelle 16), hatte sich dadurch die Transkription von "aktivierter DNA" auf ein Drittel verringert, während alle anderen Werte anstiegen. Dies bedeutet die Abtrennung der DNA-Polymerase α aus der Fraktion III. Wie bereits bei der Aufarbeitung des Ovarialkarzinoms erwähnt wurde, werden DNA-Polymerasen α und γ in der DE 52-Trennung bei 0,3 M KCl eluiert. Die $(dA)_n.(dT)_{10}$-abhängi-

TABELLE 16: SPEZIFISCHE DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT WÄHREND DER REINIGUNG DER REVERSE TRANSKRIPTASE AUS MAMMAKARZINOM IN ABHÄNGIGKEIT VON VERSCHIEDENEN MATRIZEN-PRIMERN

		Einbau von ^{3}H-dNMP in DNA (pMol/30 Minuten/mg Protein)				
		^{3}H-dGMP	^{3}H-dGMP	^{3}H-dTMP	^{3}H-dTMP	^{3}H-dTMP
		Zur Untersuchung der Fraktionen verwendete Matrizen-Primer:				
	Fraktion	$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$	$(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$	$(rA)_n \cdot (dT)_{12}$	$(dA)_n \cdot (dT)_{10}$	aktiv. DNA
I	Rohextrakt	0,3 (0,26)*	0,3	0,9	2,2	0,9
II	Mikrosomales Pellet	1,0 (1,48)*	1,0	2,7	10,1	10,4
III	DE 52, Pool (0,06-0,1 M KCl)	9,7 (0,90)*	3,9	15,5	43,2	3,2
IV	P 11 (0,185 M KCl)	265,5	32,9	4,6	0	13,8
V	P 11 (0,32 M KCl)	192,6	39,4	149,8	31,2	15,9
VI	IEF (IP 7,3)	(min. 689)**	(min. 63)**	0	0	(min. 79)**
VII	IEF (IP 5,4)	(min. 212)**	(min. 27)**	(min. 65)**	0	(min. 52)**

*(endogene Enzymaktivität)

**(Diese Werte wurden auf die gesamte für die Trennung verwendete Proteinmenge bezogen und

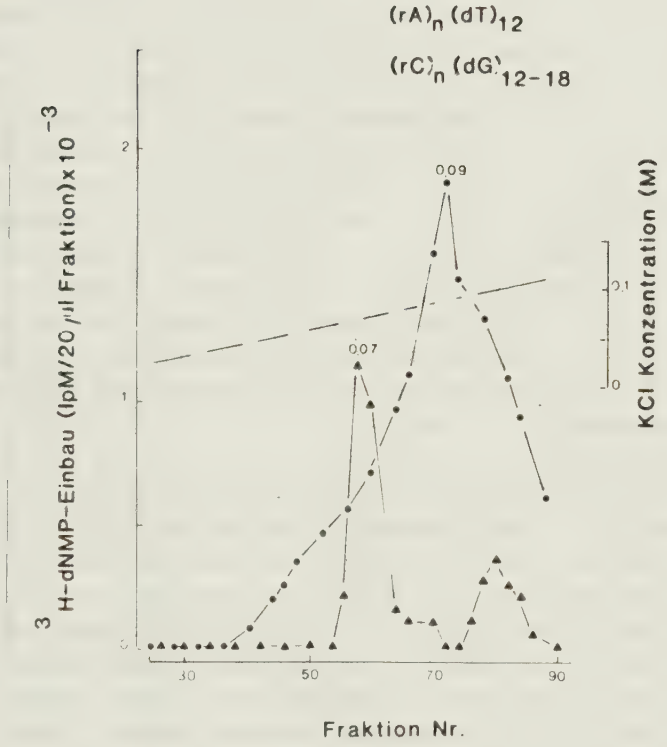


ABBILDUNG 25: DEAE-CELLULOSE-CHROMATOGRAPHIE (DE 52) DER MIKROSOMALEN FRAKTION.
Die Einzelheiten des Nachweises der DNA-Polymerasen mit Hilfe der DNA-Biosynthese, sind unter Abschnitt 3.8.3. beschrieben.

ge Aktivität hatte sich noch einmal vervierfacht und man muß demnach annehmen, daß in der Fraktion III zusammen mit der gesuchten Reverse Transkriptase-Aktivität noch DNA-Polymerase β und vielleicht auch γ enthalten sind. Schließlich weist der 4-bis 9-fache Anstieg der Enzymaktivität mit den Reverse Transkriptase-spezifischen Template-Primern auf eine deutliche Anreicherung der Reverse Transkriptase hin. Die relativ hohen spezifischen Aktivitäten in Gegenwart von $(rA)_n.(dT)_{12}$ können aber auch durch Anteile noch enthaltener DNA-Polymerase γ mit verursacht worden sein.
Im Vergleich zu der Enzymaktivität, welche mit den exogenen Matrizen gefunden wurde, war die endogene Reaktion nur schwach; dies ist auf die weitere Abnahme des Nukleinsäuregehalts zurückzuführen.

Die Fraktion III konnte in der Phosphocellulose-Chromatographie mit einem linearen Gradienten von 0,05-1,0 M KCl in zwei Enzympeaks aufgetrennt werden, einen bei 0,185 M KCl und einen bei 0,32 M KCl (Abb. 26). Der erste Peak wurde von 0,17 bis 0,22 M KCl abgetrennt und ergab nach der Dialyse die Fraktion IV. Der danach folgende kleine Peak mit $(rA)_n.(dT)_{12}$-Aktivität wurde dabei nicht berücksichtigt. Die bei 0,185 M KCl eluierte Fraktion enthielt somit fast nur $(rC)_n.(dG)_{12-18}$-abhängige Aktivität (Tabelle 16); diese war gegenüber Fraktion III (DE 52) ca. 26 mal größer geworden. Außerdem wurde auch $(rC_m)_n.(dG)_{12-18}$ 8,6 mal besser transkribiert, während $(rA)_n.(dT)_{12}$ und $(dA)_n.(dT)_{10}$ gar nicht mehr abgelesen wurden. Diese Fraktion zeigte also Eigenschaften, die in spezifischer Weise auf gereinigte Reverse Transkriptase zutreffen.
Auch in dem bei 0,32 M KCl eluierten Peak trat die $(rA)_n.(dT)_{12}$-abhängige Aktivität etwas später auf als die $(rC)_n.(dG)_{12-18}$-abhängige (Abb. 26). Das Eluat wurde von 0,3 - 0,45 M KCl vereinigt, dialysiert und bildete die Fraktion V. Die darin enthaltene Enzymaktivität war in der Lage alle exogenen Matrizen zu verwenden (Tabelle 16). Sie transkribierte $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ und $(rA)_n.(dT)_{12}$ sehr gut, wobei auffallenderweise die zuerstgenannte Aktivität höher war als die

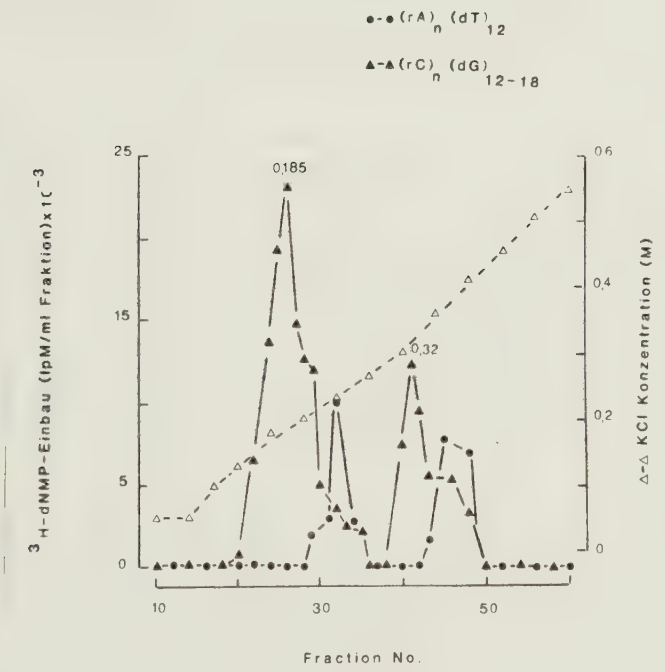


ABBILDUNG 26: AUFTRENNUNG VON REVERSE TRANSKRIPTASE UND DNA-POLYMERASE γ AUF DER PHOSPHOCELLULOSE-SÄULE (P 11) (0,06-0,1 M KCL POOL DER DEAE-CELLULOSESÄULE (DE 52)).
Die Einzelheiten des Nachweises der Reverse Transkriptase (0,185 M KCl) und DNA-Polymerase γ (0,32 M KCl) mit Hilfe der DNA-Biosynthese, sind unter Abschnitt 3.8.3. beschrieben.

zweite, außerdem aber auch noch $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$ und $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$. Aufgrund dieser Ergebnisse war anzunehmen, daß diese Fraktion außer Reverse Transkriptase, DNA-Polymerase γ und wahrscheinlich auch noch DNA-Polymerase β enthielt. Daher wurde diese Fraktion (V) nicht weiter charakterisiert.

Die Fraktion IV, welche vermutlich nur Reverse Transkriptase enthielt, wurde mit der präparativen Elektrofokusierung weiter analysiert. Dabei wurde eine Aufspaltung in zwei Enzymaktivitäten erreicht, die als deutlich getrennte Peaks bei pH 7,3 und pH 5,4 nachgewiesen wurden (Abb. 27). Wie schon bei der Phosphocellulose-Chromatographie bestand der eine Peak (IP 7,3) fast vollständig aus $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$-abhängiger Aktivität, während der zweite Peak (IP 5,4) mit dieser Matrize nur 30% der Aktivität des ersten Peaks erreichte, und außerdem auch deutliche Anteile von $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$-Aktivität aufwies.
Die beiden Peaks wurden in den Fraktionen VI (IP 7,3) und VII (IP 5,4) vereinigt. Wie schon bei der Isolierung der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom (vergl. Abschnitt 4.1.4.) müssen auch hier nach der Dialyse noch Reste des IEF-Mediums in den beiden Fraktionen enthalten gewesen sein, die die Proteinbestimmung empfindlich gestört haben. Deshalb konnte die spezifische Enzymaktivität auch nur näherungsweise, als Minimalwert, berechnet werden (Werte im Klammern), indem angenommen wurde, daß sich die zur IEF-Trennung eingesetzte Proteinmenge nicht verringert habe und vollständig in den Fraktion VI oder VII enthalten sei.
Die so erhaltenen spezifischen Enzymaktivitäten waren bei beiden IEF-Fraktionen mit $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ ungefähr 8 bzw. 11 mal höher als mit $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$. Auch in der Fraktion IV hatte dieses Verhältnis schon 8:1 betragen. Besonders auffällig ist, daß die geringe in Fraktion IV enthaltene $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$-abhängige Aktivität ausschließlich in die Fraktion VII (IP 5,4) gewandert ist, während die Fraktion VI (IP 7,3) ganz frei davon war. Das macht besonders deutlich, daß aus der Fraktion IV zwei unterschiedliche Rever-

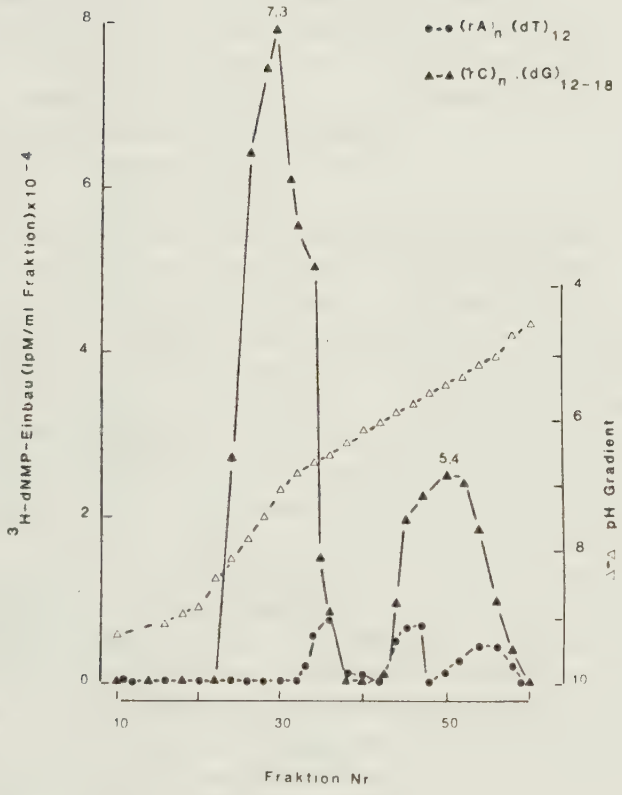


ABBILDUNG 27: ISOELEKTROFOKUSIERUNG DER FRAKTION IV (0,16-0,22 M KCL ELUAT DER PHOSPHOCELLULOSE-CHROMATOGRAPHIE).
Die Einzelheiten des Nachweises der Reverse Transkriptase-Aktivität mit Hilfe der DNA-Biosynthese, sind unter Abschnitt 3.8.3. beschrieben.

se Transkriptase-Aktivitäten herausgespalten worden sind. Die eine (von IP 7,3) transkribierte $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ in besonders hohem Maße und $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ gar nicht, während die zweite Enzymaktivität (von IP 5,4) einerseits $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ nur 0,3 mal so gut transkribierte und andererseits auch $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ ablesen konnte.

Die Berechnung des Anreicherungseffektes der Enzymaktivitäten während der Isolierung ist in den Tabellen 17-19 für die drei Reverse Transkriptase-spezifischen Matrizen angegeben. Mit jedem Reinigungsschritt der Prozedur, trat in den Fraktionen I bis IV eine deutliche Abnahme des Gesamtproteingehaltes ein: bei der Isolierung des mikrosomalen Pellets um das 30-fache und bei den Säulechromatographien jeweils um das 13-15 fache. Für die Fraktionen VI und VII ist nur der in die IEF-Trennung eingesetzte Proteingehalt angebbar, weil die Proteinbestimmung versagte.
Die Gesamtaktivität nahm während der Reinigungsprozedur in den Fraktionen I-IV durch Abtrennungsverluste und Denaturierung ständig ab, wie für alle drei Matrizen zu erkennen ist. Als Ausnahme davon konnte mit $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ nach der Phosphocellulose-Chromatographie in der Fraktion IV eine deutliche Zunahme, gegenüber der Fraktion III festgestellt werden. Die Stimulierung der Enzymaktivität könnte sich jedoch hier dadurch erklären, daß während der Phosphocellulose-Chromatographie eine Komponente abgetrennt wurde, die sich hemmend oder regulierend auf die Enzymaktivität ausgewirkt hatte. Dieser Trend setzte sich dann bei der weiteren Reinigung fort. In den Tabellen 17-19 ist an den Werten der Gesamtaktivität der Fraktionen VI und VII, die ganz unabhängig vom Proteingehalt berechnet werden, deutlich zu erkennen, daß durch die IEF für alle drei Reverse Transkriptase-spezifischen Matrizen eine mehr oder weniger starke Stimulierung der Transkriptionseffektivität eingetreten ist. Man muß beim Vergleichen zusätzlich berücksichtigen, daß die Werte der Gesamtaktivität bei den Fraktionen VI und VII nur für den Proteinanteil von Fraktion IV gelten, der für die IEF-Trennung verwendet werden konnte.

TABELLE 17: GESAMTAKTIVITÄT UND REINIGUNGSGRAD DER DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT WÄHREND DER EINZELNEN REINIGUNGSPHASEN MIT Mg^{++}-IONEN UND $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ ALS MATRIZEN-PRIMER

		Einbau von ^{3}H-dGMP in DNA (pMol/30 Minuten/mg Protein)				
	Fraktion	Protein-menge (mg)	Gesamtaktivität (pMol/30 Min.)	Gesamt-aktivität (%)	Spezifische Aktivität (pMol/30 Min./mg Prot.)	Reinigungs-grad
I	Rohextrakt	4641	1388,5	100	0,3	1
II	Mikrosomales Pellet	151,5	155,4	11	1,0	3
III	DE 52, Pool (0,06-0,1 M KCl)	11,9	115,8	8	9,7	32
IV	P 11 (0,185 M KCl)	0,8	220,4	16	265,5	885
V	P 11 (0,32 M KCl)	0,3	61,3	4	192,6	642
VI	IEF (IP 7,3)	(max. 0,5)*	358,1	26	(min. 689)*	(min. 2293)*
VII	IEF (IP 5,4)	(max. 0,5)*	110,2	8	(min. 212)*	(min. 706)*

*(Gesamte in der Trennung eingesetzte Proteinmenge und damit berechnete Werte)

TABELLE 18: GESAMTAKTIVITÄT UND REINIGUNGSGRAD DER DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT WÄHREND DER EINZELNEN REINIGUNGSPHASEN MIT Mn^{++}-IONEN UND $(rC_m)_n.(dG)_{12-18}$ ALS MATRIZEN-PRIMER

		Einbau von ^{3}H-dGMP in DNA (pMol/30 Minuten/mg Protein)				
	Fraktion	Protein-menge (mg)	Gesamtaktivität (pMol/30 Min.)	Gesamt-aktivität (%)	Spezifische Aktivität (pMol/30 Min./mg Prot.)	Reinigungs-grad
I	Rohextrakt	4641	1507,5	100	0,3	1
II	Mikrosomales Pellet	151,5	150,3	10	1,0	3
III	DE 52, Pool (0,06-0,1 M KCl)	11,9	45,9	3	3,9	12
IV	P 11 (0,185 M KCl)	0,8	27,3	2	32,9	103
V	P 11 (0,32 M KCl)	0,3	12,6	0,8	32,9	123
VI	IEF (IP 7,3)	(max. 0,5)*	32,8	2	(min. 63)*	(min. 210)*
VII	IEF (IP 5,4)	(max. 0,5)*	13,9	0,9	(min. 27)*	(min. 89)*

*(Gesamte in der Trennung eingesetzte Proteinmenge und damit berechnete Werte)

TABELLE 19: GESAMTAKTIVITÄT UND REINIGUNGSGRAD DER DNA-POLYMERASEAKTIVITÄT WÄHREND DER EINZELN REINIGUNGSPHASEN MIT Mg^{++}-IONEN UND $(rA)_n.(dT)_{12}$ ALS MATRIZEN-PRIMER

		Einbau von ^{3}H-dTMP in DNA (pMol/30 Minuten/mg Protein)				
	Fraktion	Protein-menge (mg)	Gesamtaktivität (pMol/30 Min.)	Gesamt-aktivität (%)	Spezifische Aktivität (pMol/30 Min./mg Prot.)	Reinigungs-grad
I	Rohextrakt	4641	4156	100	0,9	1
II	Mikrosomales Pellet	151,5	412,1	10	2,7	3
III	DE 52, Pool (0,06-0,1 M KCl)	11,9	184,9	4	15,5	17
IV	P 11 (0,185 M KCl)	0,8	3,7	0	4,6	5
V	P 11 (0,32 M KCl)	0,3	44,9	1,1	149,8	176
VI	IEF (IP 7,3)	(max. 0,5)*	0	0	0	0
VII	IEF (IP 5,4)	(max. 0,5)*	33,8	0,8	(min. 65)*	(min. 72)*

*(Gesamte in der Trennung eingesetzte Proteinmenge und damit berechnete Werte)

Die spezifische Enzymaktivität nahm zunächst, wegen der Abnahme des Proteingehaltes, während des gesamten Trennungsganges zu und zwar besonders durch die Phosphocellulose-Chromatographie. Die weitere Zunahme wird bei den Fraktionen IV, VI und VII allerdings auch auf die oben geschilderte Stimulierung der Enzymaktivität zurückzuführen sein. Der scheinbare Reinigungsgrad der bei 0,185 M KCl eluierten Fraktion (IV) war dann 885-fach für die Bestimmung mit $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$. In den IEF-Fraktionen wurden, wenn man einmal mit dem maximal enthaltenen Proteingehalt rechnet, Reinigungsgrade von mindestens 2293-fach (Fraktion VI) und 706-fach (Fraktion VII) erreicht.

Die Reinheit der Enzymfraktionen aus dem Mammakarzinom wurde mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden Proben der Fraktionen IV, VI und VII durch Dialyse konzentriert und zur Denaturierung mit DTT und 0,2% SDS für 5 Minuten auf 100 ^{o}C erhitzt. Diese Trennungen waren zunächst nicht anfärbbar. Vermutlich war der Proteingehalt dazu zu gering, denn für die Elektrophorese dieser Fraktionen wurde viel weniger Protein auf das Gel aufgetragen als aufgrund einer Proteinbestimmung zunächst angenommen worden war. Nach einer äußerst starken Konzentrierung (mehr als 50-fach) der beiden IEF-Fraktionen durch Dialyse, konnten später bei einer Wiederholung der SDS-Elektrophorese, doch noch anfärbbare Banden erhalten werden. Dazu standen leider nur noch die beiden IEF-Fraktionen zu Verfügung (Abb. 28). Durch die zwischenzeitliche Lagerung der Enzyme, die zum Abbau geführt haben kann und vor allem wegen der starken Konzentrierung der Enzymlösungen waren im unteren Bereich des Gels Anfärbungen sichbar, die von unspezifischen Peptiden und Ampholinresten herrührten. Im Bereich der hochmolekularen Peptide weisen die Trennungen der Fraktionen vom IP 7,3 und IP 5,4 beide an der gleiche Stelle eine deutlich von Hintergrund abgehobene Bande auf. Aus der Migration der Banden ließ sich mit Hilfe der Markerproteine das Molekulargewicht zu 67.000 bestimmen (Abb. 29). Wegen des mit den verschiedenen Reinigungsschritten erreichten Reinigungsgrads, ist es sehr

ABBILDUNG 28: SDS-GELELEKTROPHORESE DER ISOLIERTEN REVERSE TRANSKRIPTASE AUS MAMMAKARZINOM.
Die Densitometeraufzeichnungen geben die Laufrichtung der Peptide von links nach rechts wieder. Von oben nach unten sind die Trennungen von den Fraktionen VI und VII und der Markerproteine dargestellt. Die Einzelheiten des Nachweises der Reverse Transkriptase-Trennung sind unter Abschnitt 3.11.1. beschrieben.

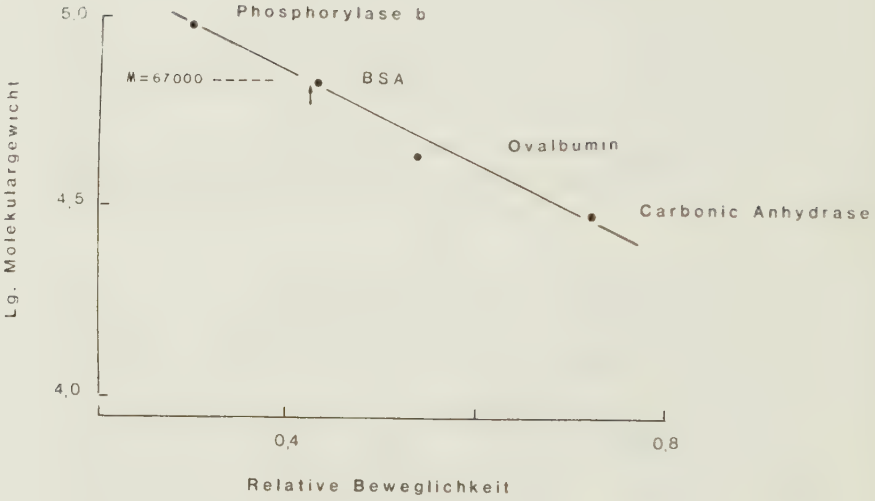


ABBILDUNG 29: MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG DER GEREINIGTEN REVERSE TRANSKRIPTASE AUS MAMMAKARZINOM. Die Einzelheiten dieser Untersuchung sind unter Abschnitt 3.11.1. beschrieben.

wahrscheinlich, daß es sich dabei um die durch IP 7,3 und 5,4 gekennzeichneten Reverse Transkriptase-Aktivitäten handelt. Aus Tabelle 2 kann man entnehmen, daß die meisten Reverse Transkriptasen aus menschlichem Krebsgewebe als Monomere beschrieben wurden, deren Molekulargewicht zwischen 68.000 und 95.000 liegt. Insbesondere fanden OHNO et al. (1977), daß die aus einem Mammakarzinom isolierte Reverse Transkriptase bei der Bestimmung durch Glyzeringradientenzentrifugation ein Molekulargewicht von etwa 70.000 aufwies. MARCUS et al. (1976) berichten, daß für die Reverse Transkriptase aus MuMTV entsprechend der Meßmethode unterschiedliche Molekulargewichte erhalten wurden. Nach der Sedimentationsgeschwindigkeit des nativen Enzyms wurde 108.000 bestimmt; dagegen wurden mit der SDS-Gelelektrophorese neben zwei kleineren, zwei größere Polypeptide von 85.000 und 50.000 nachgewiesen.

Die Fraktionen IV bis VII wurden nach ihrer Gewinnung biochemisch charakterisiert. Die erste Methode dazu, die Affinität zu spezifischen Matrizen-Primern, wurde bereits anhand von Tabelle 16 diskutiert.

Wie man aus Tabelle 20 entnehmen kann, enthielt die isolierte Reverse Transkriptase keine Terminaltransferaseaktivität, da sie mit verschiedenen Startern keine ^{3}H-dNMP-Einbau zeigte.

Anschließend wurde die Abhängigkeit von den zweiwertigen Ionen Mn^{++} und Mg^{++} untersucht. Die Mg^{++}-Konzentration wurde zwischen 1-12 mM variiert und die Reaktion der Reverse Transkriptase-Fraktion in Gegenwart der Matrize $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ und der optimalen Konzentration an K^{+}-Ionen durchgeführt. Es ergab sich eine starke Abhängigkeit des katalytischen Effektes von der Mg^{++}-Konzentration mit einen Optimum bei 10 mM (Abb. 30). Die verwendeten Mn^{++}-Konzentrationen reichten von 0,1 bis 1,2 mM. Die Enzymaktivität der Reverse Transkriptase-Fraktion reagierte auf diese Konzentrationsänderung weniger empfindlich als bei den Mg^{++}-Ionen und der maximale

TABELLE 20: UNTERSUCHUNG DER GEREINIGTEN REVERSE TRANSKRIPTASE AUF TERMINALTRANSFERASE-AKTIVITÄT

Matrize-Primer oder Primer	Substrat	Einbau von ^{3}H-dGMP in DNA (pMol/mg Protein)
$(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$	^{3}H-dGMP dCTP/dGTP	265,5
Poly(dA)	^{3}H-dGMP dGTP	0
$Oligo(dG)_{12-18}$	^{3}H-dGMP dATP/dTTP/dCTP	0
$Oligo(dT)_{12-18}$	^{3}H-dGMP dATP/dTTP/dCTP	0

Die Einzelheiten der Reaktion sind unter Abschnitt 3.9.5. beschrieben.

Wert, der bei 1,2 mM erreicht wurde, war auch nur halb so hoch.
Auch aus der Literatur sind einige Fälle bekannt (vergl. Tabelle 2), in denen gereinigte Reverse Transkriptasen die Mg^{++}-Ionen im Vergleich zu Mn^{++}-Ionen deutlich bevorzugten. RHO et al. (1981) beschrieben eine aus der Kultur von T-Zellen eines Hautlymphoms des Menschen isolierte Reverse Transkriptase, die mit der Matrize $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ das Optimum bei der Mg^{++}-Konzentration von 30 mM hatte. Auch OHNO et al. (1977) erhielten bei der Untersuchung der aus Mammakarzinom gereinigten Reverse Transkriptase eine optimale Aktivität mit Mg^{++}-Ionen (5-7 mM) wobei sie allerdings die Matrize $(rA)_n.(dT)_{12}$ verwendeten.
Die beiden aus der Fraktion IV durch IEF gewonnenen Fraktionen VI und VII zeigten bei diesem Experiment ein unterschiedliches Verhalten (Abb. 31). Die Enzymfraktion mit IP 7,3 wurde durch Metallionen deutlich stimuliert und der Aktivitätsanstieg erfolgte in Abhängigkeit von der Konzentration. Dabei waren im untersuchten Konzentrationsbereich die Mg^{++}-Ionen gegenüber Mn^{++}-Ionen wesentlich wirksamer, denn das Optimum bei 8 mM Mg^{++} erreichte den doppelten Wert als das bei 1,2 mM Mn^{++}. Diese beiden Kurven weisen große Ähnlichkeit mit denen auf, die mit der Fraktion IV erhalten wurden. Die Enzymfraktion mit IP 5,4 zeigte dagegen in Gegenwart der zweiwertigen Kationen nur eine schwache Aktivitätszunahme und es ließen sich kaum Unterschiede zwischen Mn^{++} und Mg^{++} feststellen. Die Aktivität in der Fraktion von IP 5,4 (VII) war nur halb so groß wie bei der Mg^{++}-Stimulation der Fraktion IP 7,3 (VI); dieser Unterschied war auch schon gleich nach der Abtrennung zu erkennen (vergl. Abb. 26 und Tabelle 16).

Die Transkription der heteropolymeren Regionen einer viralen 70 S RNA dient als wichtige biochemische Charakterisierung, die einen grundlegenden Hinweis auf das Vorliegen einer virusähnlichen Reverse Transkriptase gibt. Dazu wurde den Reaktionsgemischen als exogene Matrize die aus AMV isolierte, natürliche 70 S RNA zusammen mit dem Starter

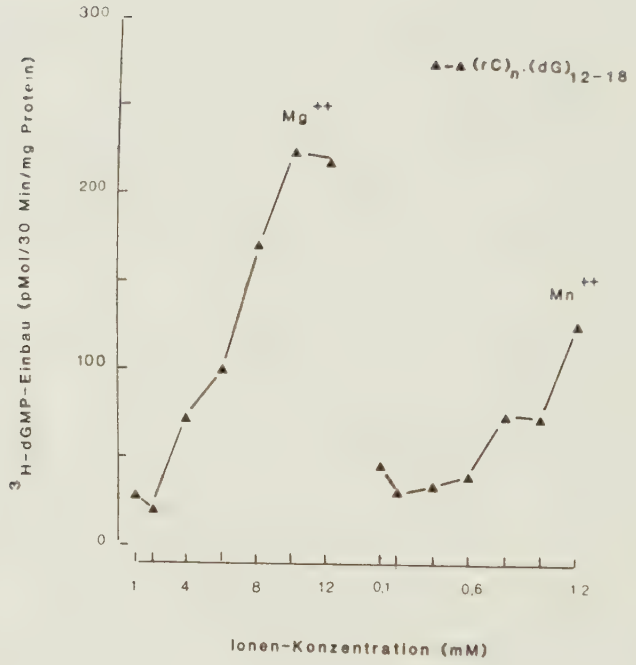


ABBILDUNG 30: EINFLUSS VERSCHIEDENER METALLIONEN-KONZENTRATIONEN AUF DIE REVERSE TRANSKRIPTASE-AKTIVITÄT. Die Einzelheiten dieser Untersuchungen sind unter Abschnitt 3.9.1. beschrieben.

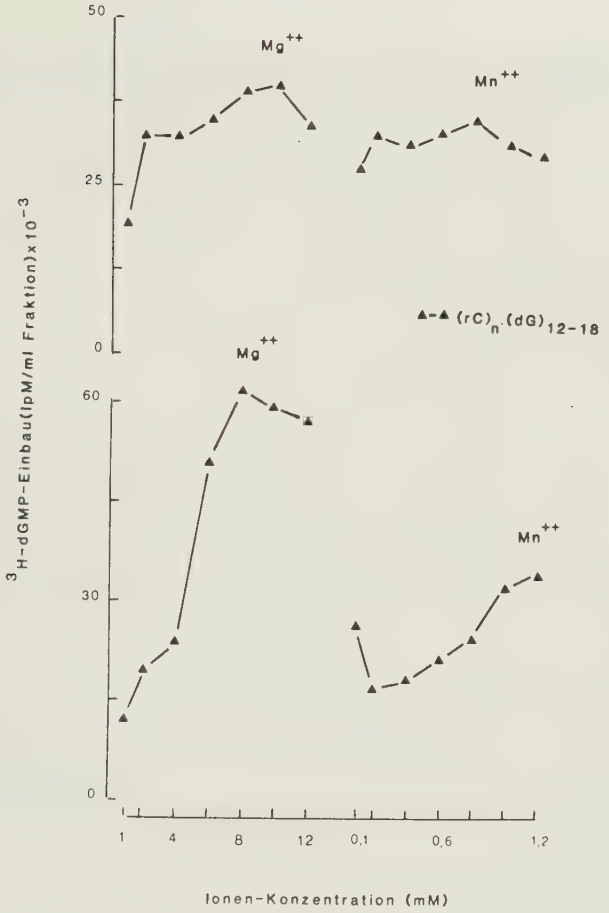


ABBILDUNG 31: EINFLUSS DER MN^{++}- ODER MG^{++}-KONZENTRATIONEN AUF DIE REVERSE TRANSKRIPTASE-AKTIVITÄTEN DER IEF-FRAKTIONEN DES MAMMAKARZINOMS.
Die Einzelheiten dieser Untersuchungen sind unter Abschnitt 3.9.1. beschrieben.
Oben: Fraktion VII (IP 5,4)
Unten: Fraktion VI (IP 7,3).

Oligo(dT)$_{12-18}$ zugefügt. Hierbei wurden nur die IEF-gereinigten Fraktionen (IP 7,3 und IP 5,4) untersucht. Bei beiden Proben wurden der ^{3}H-dGMP-Einbau sowie der ^{3}H-dTMP-Einbau bei der optimalen Mg^{++}-Konzentration gemessen.
Wie man aus Tabelle 21 entnehmen kann, war in Gegenwart des Starters alleine bei keiner der Fraktionen Enzymaktivität nachweisbar. Die IEF-Fraktionen von IP 7,3 und IP 5,4 waren beide in der Lage die 70 S RNA aus AMV mit Oligo(dT)$_{12-18}$ als Matrizen-Primer-Kombination zu verwenden. Interessanterweise war die Reaktion, die mit ^{3}H-dGTP nachgewiesen werden konnte bei der Fraktion von IP 7,3 mehr als fünfeinhalbmal so effektiv und bei der Fraktion von IP 5,4 fast eineinhalbmal so effektiv wie die mit ^{3}H-dTTP beobachtete Reaktion. Diese Enzymaktivitäten bevorzugen also bei der Transkription die heteropolymeren Bereiche des natürlichen Virusgenoms gegenüber den Poly(A)-Sequenzen. Die geringe Affinität zu Poly(A)-Sequenzen zeigte sich auch schon mit dem Matrizen-Primer $(rA)_n.(dT)_{12}$, der mit der Fraktion von IP 7,3 überhaupt nicht und mit der Fraktion von IP 5,4 nur in vergleichsweise geringerem Umfang abgelesen wurde (vergl. Tabelle 16 und Abb. 26). Diese Ergebnisse belegen nun sehr deutlich, daß mit der bei 0,185 M KCl eluierten Phosphocellulose-Fraktion, tatsächlich eine Enzymaktivität isoliert wurde, deren biochemische Eigenschaften denen der viralen Reverse Transkriptase entsprechen.

Als letzte biochemische Eigenschaft wurde die Temperaturempfindlichkeit der isolierten Reverse Transkriptase untersucht. Bei diesem Experiment wurden die Fraktionen VI und VII, welche hochgereinigte Reverse Transkriptase enthielten, für verschiedene Zeitabschnitte bei 45 ^{o}C vorinkubiert und anschliessend die Reverse Transkriptase-Reaktion mit $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ als Matrize unter den normalen Bedingungen durchgeführt.
Die Kinetik ist in Abb. 32 dargestellt. Man erkennt, daß die Enzymwirkung in beiden Fraktionen durch die Wärme schnell nachläßt. Die Halbwertszeiten für die Inaktivierung betrugen etwa 10,5 Minuten (IP 7,3) und etwa 7 Min. (IP 5,4).

TABELLE 21: TRANSKRIPTION DER HETEROPOLYMEREN REGIONEN VON 70 S RNA AUS AMV DURCH DIE REVERSE TRANSKRIPTASE AUS MAMMAKARZINOM

Fraktion	Matrizen-Primer	Einbau von ^{3}H-dNMP in DNA (pMol/30 Minuten)	
		^{3}H-dGMP	^{3}H-dTMP
IEF (IP 7,3) (Fraktion VI)	70 S RNA + $p(dT)_{12-18}$	138,2	24,7
	$p(dT)_{12-18}$	0	0
IEF (IP 5,4) (Fraktion VII)	70 S RNA + $p(dT)_{12-18}$	94,4	67,7
	$p(dT)_{12-18}$	0	0

Die Einzelheiten der Reaktion sind unter Abschnitt 3.9.4. beschrieben.

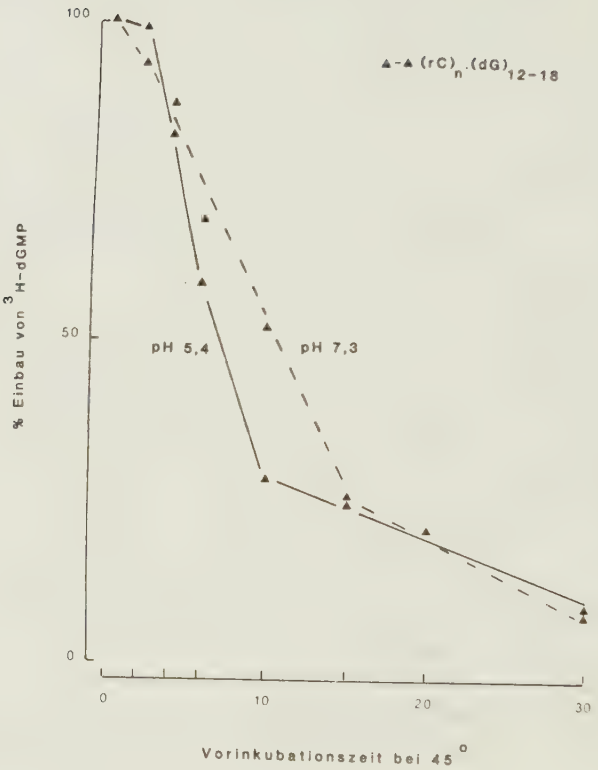


ABBILDUNG 32: THERMOLABILITÄT DER REVERSE TRANSKRIPTASE. Die Einzelheiten dieser Untersuchung sind unter Abschnitt 3.9.6. beschrieben.

5. DISKUSSION

Die Isolierung eines Retrovirus aus einem T-Zell-Lymphom und seine Charakterisierung haben bewiesen, daß diese Viren bei der Entstehung menschlicher Tumoren eine Rolle spielen können (POIESZ et al. 1980). Die Versuche, die mögliche Anwesenheit solcher Viren in den Krebsgeweben aufzuzeigen und daraus komplette und infektiöse Partikel zu isolieren, die ähnliche biologische Eigenschaften besitzen wie die schon aus Tieren bekannten Retroviren, haben sich aber immer wieder als sehr schwierig erwiesen.
Indirekte Hinweise, daß Retroviren mit menschlichen Tumoren in Beziehung stehen, wurden anhand vieler Nachweise von viralen Komponenten in Tumoren erbracht (vergl. Abschnitt 1.4.). Die Isolierung der Reverse Transkriptase und ihre biochemische und serologische Charakterisierung hat zu diesen Ergebnissen wesentlich beigetragen (GALLO et al. 1974; WITKIN et al. 1975; CHANDRA und STEEL 1977; OHNO et al. 1977; OHNO und SPIEGELMAN 1977; CHANDRA et al. 1978; EBENER et al. 1979; WELTE et al. 1979; GOODENOW und KAPLAN 1979; RHO et al. 1981; VOGEL und CHANDRA 1981).
Da das Enzym ein charakteristischer Bestandteil aller Retroviren ist, wird es auch in eukaryontischen Zellen als Marker für die Anwesenheit dieser Viren gewertet. Die Funktion der Reverse Transkriptase im Replikationszyklus der Retroviren (vergl. Abschnitt 1.3.4.), führt zur Bildung der proviralen, linearen DNA, und stellt eine wesentliche Voraussetzung für die Vermehrung der Virusgene im Organismus dar. Krebsauslösende Virusgene (onc, src) wurden schon bei Retroviren der Säugetiere und der Vögel beschrieben (DUESBERG und BISTER 1980).

Reverse Transkriptasen aus adulten, ausdifferenzierten Geweben sind nur im Zusammenhang mit isolierbaren Viruspartikeln, oder bei Tumoren bekannt geworden. In normalen, adulten Zellen, die virusfrei sind, scheint dieses Enzym nicht vorzukommen, wenn auch ältere Untersuchungen, die kurz nach der Entdeckung des retroviralen Enzyms durchgeführt wurden, davon berichten (SCOLNICK et al. 1971; STAVRIANOPOULOS et al. 1971).

Damals wurde aber lediglich der Matrizen-Primer $(rA)_n.(dT)_{12}$ zum Nachweis benutzt. Heute weiß man, daß diese Matrize auch von zellulären DNA-Polymerasen transkribiert werden kann und wahrscheinlich wurde die Reverse Transkriptase-Aktivität in diesen Untersuchungen durch DNA-Polymerase γ vorgetäuscht.

Eine DNA-Polymeraseaktivität in menschlichem Tumorgewebe liefert nur dann einen Hinweis auf die Anwesenheit von Retroviren, wenn sie ähnliche Eigenschaften aufweist wie die Reverse Transkriptasen der bekannten Retroviren bei Säugetieren. Daher ist es notwendig, eine Reverse Transkriptase-ähnliche Enzymaktivität schon auf der biochemischen Ebene von den verschiedenen anderen DNA-Polymerasen zu unterscheiden, die auch in den nicht infizierten Zellen vorkommen. GOODMAN und SPIEGELMAN (1971) sowie GALLO et al. (1974) haben dazu eine Reihe von Kriterien ausgearbeitet, die eindeutig auf die Enzymaktivität einer Reverse Transkriptase hinweisen:

a) Sie soll in der mikrosomalen Fraktion der Zellen enthalten sein und in einer endogenen Reaktion DNA synthetisieren können;
b) sie soll die heteropolymeren Bereiche von exogen[illegible] zugesetzter viraler RNA transkribieren können;
c) sie soll Ribonukleinsäure-Templates besser transkribieren können als Desoxyribonukleinsäure-Templates;
d) sie soll bei einer Phosphocellulose-Chromatographie in einer charakteristischen Position von der Säule eluiert werden können.

Zusätzlich zu den biochemischen Eigenschaften, wäre es wichtig zu wissen, ob und welche serologischen Beziehungen zwischen Reverse Transkriptase aus den verschiedenen Tumoren und den Retroviren tierischen Ursprungs bestehen.

Zur Isolierung des Enzyms wurde in der vorliegenden Arbeit eine mehrstufige Methode verwendet (Abb. 10), bei der auf die Gewinnung der mikrosomalen Fraktion zwei Anionenaustauscher-Chromatographien und eine Kationenaustauscher-Chromatographie mit Phosphocellulose folgten. Die Ergebnisse die-

ser Reinigungsschritte sind in den Abb. 11-13 dargestellt. Bei der Phosphocellulose-Chromatographie (Abb. 13) enthielt das Elutionsprofil zwei DNA-Polymeraseaktivitäten: eine bei 0,225 M KCl und die andere bei 0,3 M KCl. Der erste Wert stimmt mit der Position überein bei der schon früher gereinigte Reverse Transkriptasen aus verschiedenen Tumorgeweben von Phosphocellulose-Säulen eluiert wurden (OHNO et al. 1977; CHANDRA und STEEL 1977 und 1980; CHANDRA et al. 1978; EBENER et al. 1979; LOEWENSTEIN et al. 1980; RHO et al. 1981). Andererseits haben viele Autoren die DNA-Polymerase γ bei einer KCl-Konzentration von 0,3 M von der Phosphocellulose-Säule eluiert (LEWIS et al. 1974; KNOPF et al. 1976; ROBERT-GUROFF et al. 1977; SARNGADHARAN et al. 1978; CHANDRA et al. 1981).

Als Voraussetzung für die biochemische Charakterisierung wurde die Reinheit des isolierten Enzyms überprüft. Bei der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 15, zweite von oben) ergab die Enzymaktivität, welche bei 0,225 M KCl von der Phosphocellulose eluiert worden war, zunächst eine einzelne Hauptbande. Die Frage der Homogenität wird noch im Zusammenhang mit dem Ergebnis der IEF diskutiert werden. Außerdem enthielt das Enzympräparat keine Terminaltransferase-Aktivität (Tab. 14).

Im Sinne der vorher genannten Kriterien, die zur Identifizierung einer Reverse Transkriptase geeignet sind, wurde die bei 0,225 M KCl eluierte DNA-Polymerase auf ihre Affinität zu verschiedenen Matrizen-Primern untersucht (Tab. 10). Dieses Enzym konnte $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$ nicht transkribieren. Dagegen war seine Aktivität mit $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ gut nachweisbar und sie erreichte mit $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ ihren höchsten Wert. Diese Verhältnisse deuten ebenfalls darauf hin, daß es sich nicht um eine der zellulären Polymerasen (α, β, γ) handelt. Auch $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ konnte durch dieses Enzyms mit grösserer Aktivität transkribiert werden als $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$. Diese methylierte Matrize ist sehr spezifisch für Reverse Transkriptasen aus menschlichen Tumoren, denn sie kann von den zellulären DNA-Polymerasen nicht abgelesen werden (GE-

RARD et al. 1974; GERARD 1975).
Eine DNA-Polymeraseaktivität, die durch ihre Affinität zu $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ und zu $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ gekennzeichnet war, wurde bereits von LOEWENSTEIN et al. (1980) in einem Adenokarzinom des Ovars nachgewiesen. Wegen der geringen Enzymaktivität konnte sie aber nicht nach weiteren Kriterien für virale Reverse Transkriptasen untersucht werden.

Im Gegensatz dazu, ergaben diese Untersuchungen für die bei 0,3 M KCl eluierte DNA-Polymerase eine hohe Aktivität mit $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$, die fast 13 mal höher war als mit $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$. Auch die Fähigkeit $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$ und das Unvermögen $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ zu transkribieren beweisen, daß es sich hier nicht um Reverse Transkriptase handelt. Vielmehr entsprechen diese Eigenschaften den Kriterien, die für DNA-Polymerase γ aufgestellt wurden (SPADARI und WEISSBACH 1974; GERARD et al. 1974; GERARD 1975; KNOPF et al. 1976; ROBERT-GUROFF et al. 1977 und SARNGADHARAN et al. 1978).
Anhand der Aktivität, die das Enzym mit den verschiedenen Matrizen-Primern aufwies, ließ sich der Reinigungsgrad berechnen, der bis zur Stufe der Phosphocellulose-Chromatographie durch die Isolierungsmethode erreicht wurde. Dabei diente die Enzymaktivität im Rohextrakt als Bezugswert. Da das Enzym hier noch in einem anderen Zustand, nämlich gebunden an die mikrosomale Fraktion vorlag und die zellulären DNA-Polymerasen noch nicht abgetrennt waren, hat dieser Wert zwar nur eine bedingte Ausagekraft, er kann aber doch zur Orientierung und zu Vergleichszwecken dienen. Die Reinigungsgrade berechnen sich zu 171-fach mit $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$, 324-fach mit $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ und 394-fach mit der allein für Reverse Transkriptase spezifische Matrize $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ (Tabellen 11-13). Der geringere Reinigungsgrad mit $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ ist teilweise auf die höhere spezifische Aktivität im Rohextrakt zurückzuführen, zu der die anderen DNA-Polymerasen beigetragen haben. Die in der Literatur beschriebenen Reinigungsgrade für Reverse Transkriptase aus menschlichen Tumoren liegen vorwiegend in der gleichen Größenordnung (WITKIN et al. 1975; SARNGADHARAN et al. 1972; OHNO et al.

1977; EBENER et al. 1979) und wurden nur selten nennenswert überschritten (CHANDRA und STEEL 1977, 1980; CHANDRA et al. 1978).

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von monovalenten und divalenten Metallionen ist ein bekanntes Merkmal vieler DNA-Polymerasen, welches es erlaubt, auch die viralen Reverse Transkriptasen in charakteristisch Gruppen einzuteilen (Tabelle 1). Die verschiedenen Kombinationen von synthetischen Matrizen mit Mg^{++}-Ionen oder Mn^{++}-Ionen, die zur maximalen Enzymaktivität führen, stellen biochemische Parameter dar, die Hinweise auf die Art der Retroviren liefern (VERMA 1977; SARNGADHARAN et al. 1978; FINE und SCHOCHETMAN 1978). In der gleichen Weise wird der Bedarf an Metallionen auch bei den Reverse Transkriptasen aus menschlichen Tumoren zur Klassifizierung herangezogen (Tabelle 2).

Die enzymatische Aktivität der gereinigten DNA-Polymerase (0,225 M KCl) war mit der Matrize $(rC)_n.(dG)_{12-18}$ in Gegenwart von 0,8 mM Mn^{++}-Ionen am höchsten (Abb 18 und 19). In dieser Eigenschaft weist sie eine Übereinstimmung mit den Reverse Transkriptasen der meisten C-Typ Viren auf (vergl. Tabellen 1 und 2). Das bei 0,3 M KCl eluierte Enzym bevorzugte die Kombination von $(rA)_n.(dT)_{12}$ mit Mn^{++}-Ionen (1,0 mM, Abb. 20) und bestätigte sich dadurch als DNA-Polymerase γ.

Das ph-Optimum von 8,2-8,3 lag relativ hoch (Abb. 18), ähnelt aber den Werten von 8,0 bis 8,2, die von CHANDRA und STEEL (1977), OHNO et al. (1977), EBENER et al. (1979) sowie von CHANDRA et al. (1978) für Reverse Transkriptase aus menschlichen Tumoren gefunden wurden.

Das bereits als DNA-Polymerase γ bezeichnete Enzym, hatte ein pH-Optimum von 7,4 und diese Messung stimmt mit den Ergebnissen von MATSUKAGE et al. (1975); ROBERT-GUROFF et al. (1977) und SARNGADHARAN et al. (1978), überein.

MODAK und MARCUS (1977) haben gezeigt, daß einige Reverse Transkriptasen aus tierischen C-Typ Viren durch geringe Konzentrationen von Phosphationen (1 bis 5 mM) gehemmt werden. Im Vergleich dazu werden zelluläre DNA-Polymerasen (α und γ) kaum gehemmt. Diese selektive Wirkung der Phosphationen er-

schien geeignet um das Enzym zu untersuchen (Abb. 21). Die $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$-abhängige DNA-Synthese wurde durch die steigende Phosphationenkonzentration (5 bis 67 mM) in Form einer charakteristischen Hemmkurve stark verringert. Die ausgeprägte Hemmbarkeit durch Phosphationen, die bisher für Reverse Transkriptasen aus menschlichen Tumoren noch nicht beschrieben wurde, könnte einmal ein weiteres geeignetes Kriterium werden, um solche Enzyme zu charakterisieren. Dazu sind aber noch ausführlichere Untersuchungen, insbesondere an Reverse Transkriptasen aus menschlichen Tumoren, notwendig.

Betrachtet man die bisher diskutierten Ergebnisse zusammen, so kann man sagen, daß das bei 0,225 M KCl von der Phosphocellulose eluierte, gereinigte Enzym keine der zellulären DNA-Polymerasen sein kann, sondern daß es sich um eine Reverse Transkriptase handeln muß. Als das deutlichste Kriterium für die Anwesenheit einer viralen Reverse Transkriptase wird jedoch die Transkription der heteropolymeren Sequenzen eines Retrovirus-Genoms, gewertet. Dazu kann auch exogene 70 S RNA aus nicht-homologen Viren verwendet werden (SPIEGELMAN et al. 1971; VERMA et al. 1974b; ABRELL et al. 1975; GALLO et al. 1974). Mit exogener AMV-RNA wurde gezeigt, daß die gereinigte Reverse Transkriptase aus Ovarialtumor diese Fähigkeit besaß (Tab. 15), während die DNA-Polymerase γ im Kontrollexperiment nur Poly(A)-Sequenzen ablesen konnte. Dieses Unterscheidungskriterium wurde von vielen Autoren beschrieben (LEWIS et al. 1974; SPADARI und WEISSBACH 1974; MATSUKAGE et al. 1975; KNOPF et al. 1976; ROBERT-GUROFF et al. 1977).

Nachdem das isolierte Enzym als virale Reverse Transkriptase gekennzeichnet war, wurde ihre serologische Verwandschaft mit einer Reihe von Antikörpern untersucht (Abb. 23). Die teilweise Hemmung der Enzymreaktion durch Antikörper gegen die Reverse Transkriptase eines Mäusevirus (RLV) scheint auf die Anwesenheit ähnlicher Viren im Ovarialtumorgewebe hinzuweisen. Jedoch wurden schon öfters Wechselwirkungen zwischen Reverse Transkriptasen aus menschlichen Leukämie-

zellen und solchen RLV-Antikörpern erhalten, wenn gleichzeitig deutlichere Beziehungen zu anderen Viren (z.B. SiSV, GaLV) existierten (SARNGADHARAN et al. 1972; TODARO und GALLO 1973; GALLAGHER et al. 1974). Die Bedeutung der teilweisen Hemmung bleibt deshalb unklar. Das Ausbleiben einer deutlichen Kreuzreaktion der hier isolierten Reverse Transkriptase kann auf die begrenzte Auswahl der verwendeten Antikörper zurückzuführen sein. Insbesondere standen Antikörper gegen die Reverse Transkriptase aus BaEV nicht zur Verfügung. So konnte die Beobachtung von SHERR und TODARO (1974) nicht nachgeprüft werden, die bei einem Ovarialtumor eine Kreuzreaktion mit dem p30-Antigen des C-Typ Virus BaEV erhielten.
Die Arbeitsgruppe um GALLO weist anhand mehrerer Beispiele von Reverse Transkriptasen aus menschlichen Tumoren, die biochemisch den retroviralen DNA-Polymerasen entsprachen, ausdrücklich darauf hin, daß sich nicht in jedem Falle serologische Beziehungen zu einer der bekannten Retrovirusgruppen herstellen ließen (GALLO et al. 1974; GALLAGHER 1977; RHO et al. 1981).

Da die Antigeneigenschaften der isolierten Reverse Transkriptase keine konkrete Zuordnung zu einer bestimmten Virusgruppe zuließen, wurde versucht, das Enzym durch seine physikochemischen Eigenschaften noch weiter zu charakterisieren. Dazu wurde die Temperaturstabilität der Reverse Transkriptase untersucht (Abb. 22), wobei die Fraktion der DNA-Polymerase γ zum Vergleichen diente. Die Aktivität des viralen Enzyms ließ sehr schnell nach ($t_{1/2}$ = 4 Min.), während die DNA-Polymerase γ stabiler war ($t_{1/2}$ = 13 Min.). Der einzige bekannte Vergleichswert für Reverse Transkriptase aus menschlichen Tumoren wurde parallel zu dieser Arbeit von VOGEL und CHANDRA (1981) erstellt. Dabei zeigten zwei Formen von Reverse Transkriptasen, die bei 0,26-0,33 M KCl und bei 0,5-0,6 M KCl von der Phosphocellulosesäule eluiert worden waren, unterschiedliche Halbwertszeiten: das erste Enzym etwa 30 Min. und das zweite Enzym 4 Min. mit dem Matrize-Primer $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ sowie 40 Min. mit dem Matrize-Primer

$(rA)_n \cdot (dT)_{12}$. Zum weiteren Vergleichen stehen nur Messungen an Reverse Transkriptasen von Vogel- und Mäuseviren zur Verfügung. Hier wurden Halbwertszeiten zwischen 6 und 15,5 Min. gefunden (VERMA et al. 1974a; PANET et al. 1975; VERMA 1975; TRONICK et al. 1975).

Eine wichtige Kenngröße des gereinigten Enzyms besteht in seinem Molekulargewicht (Abb. 15, obere Hälfte und Abb. 17). Es wurde mit der SDS-Gelelektrophorese zu etwa 70.800 bestimmt. Die zellulären DNA-Polymerasen weisen andere Molekulargewichte auf, wie 110.000-220.000 für DNA-Polymerase α, 45.000 für DNA-Polymerase β und 110.000-330.000 für DNA-Polymerase γ (SARNGADHARAN et al. 1978). Die meisten Reverse Transkriptasen aus menschlichen Krebsgeweben wurden als Monomere mit Molekulargewichten zwischen 68.000 und 98.000 beschrieben (vergl. Tabelle 2; WITKIN et al. 1975; CHANDRA und STEEL 1977; GALLAGHER 1977; KAPLAN et al. 1977; CHANDRA et al. 1978; EBENER et al. 1979; OHNO et al. 1977; RHO et al. 1981; VOGEL und CHANDRA 1981). Diese Werte entsprechen recht gut den Molekulargewichten von 68.000 bis 84.000, die für monomere Reverse Transkriptasen bei den schon bekannten Retroviren von Katzen, Primaten und Mäusen (C-Typ) gefunden wurden (Zitate vergl. Tabelle 1).

Eine weitere Beschreibung wurde mit der IEF versucht. Bisher liegt bereits eine solche Untersuchung einer Reverse Transkriptase aus menschlichem Gewebe durch VOGEL und CHANDRA (1981) vor. Sie erhielten zwei getrennte Banden von IP 7,2 und IP 5,5. Diese beiden Enzymaktivitäten stammten aus den beiden Reverse Transkriptase -Fraktionen, die bei 0,26-0,33 M KCl und 0,5-0,6 M KCl während der Phosphocellulose-Chromatographie eluiert worden waren.
Bei der IEF der Phosphocellulosefraktion (0,175 M KCl) der Reverse Transkriptase aus dem Ovarialkarzinom, bildeten sich Banden von IP 6,6 und IP 5,6 (Abb. 14). Die Aufspaltbarkeit in zwei Fraktionen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten ist deshalb überraschend, weil die Phosphocellulosefraktion der Reverse Transkriptase bei der SDS-Gelelektro-

phorese nur eine Hauptbande zeigte (vergl. Abb. 15, zweite von oben). Die Enzyme der beiden IEF-Fraktionen müssen darin also die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit besessen haben. Dies wurde durch das Ergebnis der SDS-Gelelektrophorese dieser Fraktionen bestätigt (Abb. 15, untere Hälfte). Beide, die bei IP 6,6 und die bei IP 5,6 isolierten Reverse Transkriptase-Aktivitäten, ergaben je eine deutliche Bande mit identischen Wandergeschwindigkeiten, die einem Molekulargewicht von etwa 68.400 entsprechen (Abb. 17). Zur Bedeutung der gleichgroßen Polypeptide in den IEF-Fraktionen kann man drei oder vier verschiedene Modelle entwickeln:

1) Es handelte sich um zwei unabhängige Reverse Transkriptasen, die im Eluat der Phosphocellulosefraktion (0,225 M KCl) vorhanden waren und die zufälligerweise das gleiche Molekulargewicht besaßen und trotz unterschiedlicher IP´s durch die Ionenaustauscher nicht getrennt wurden.
2) Es können identische Untereinheiten einer komplexeren, z.B. dimer aufgebauten Form der Reverse Transkriptase gewesen sein, wenn man bedenkt, daß bei der Spaltung in Untereinheiten saure bzw. basische Aminosäurereste freigelegt werden können, die in der Quartärstruktur eingebunden waren. In diesem Falle würde eine der beiden Fraktionen (IP 6,6 oder IP 5,6) die dissoziierten, enzymatisch aktiven Untereinheiten darstellen und die andere Fraktion, das komplette Enzym. Von diesem wären dann bei der SDS-Gelelektrophorese wieder nur die Monomeren nachweisbar gewesen.
3) Es waren zwei monomere Komponenten der Reverse Transkriptase, die bei praktisch gleichem Molekulargewicht verschiedene IP´s aufweisen. Sie könnten trotz ihrer unterschiedlichen IP´s bei den Ionenaustauscher-Chromatographien eine gemeinsame Fraktion gebildet haben; wenn sie als native Reverse Transkriptase z.B. in Form eines Dimer vorlagen, das erst während der IEF durch das elektrostatische Feld in die beiden enzymatisch aktiven Untereinheiten aufgespalten wurde. In diesem Falle ist es aber auch denkbar, daß die Spaltung nicht vollständig erfolgte und

dafür nur eine der abgespaltenen Untereinheiten enzymatische Aktivität aufwies, während die anderen unentdeckt blieben.

Bekannte Hinweise auf Dimere und inaktive bzw. aktive Untereinheiten der Reverse Transkriptase bei tierischen Retroviren wurden bereits in Abschnitt 1.5.2. zusammengestellt. Interessanterweise haben auch schon MONDAL et al. (1975) in Leukozyten eines AML-Patienten die dimere Form einer Reverse Transkriptase gefunden. Sie konnten die Molekulargewichte des Dimers und der Monomere mit der Sedimentationsgeschwindigkeit in einem Gradienten zu 130.000 und 70.000 bestimmen. Bei den Reverse Transkriptasen aus AML-Zellen, CLL-Zellen und Zellen eines Lymphoms (Hystiocyten und T-Zellen), wurden jedoch nur Monomere Formen beschrieben. Der Unterschied erkärt sich möglicherweise durch die verschiedenen Untersuchungsmethoden, welche die Autoren angewendet haben. Während der Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit können Dimere erhalten bleiben, während sie bei der SDS-Elektrophorese denaturiert werden müssen (vergl. Tab. 2).

Da die IEF im präparativen Maßstab durchgeführt wurde, konnte auch die Enzymaktivität der beiden Fraktionen (Tab. 10) untersucht werden. Dabei verhielten sie sich unterschiedlich: die Matrizen-Primer $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ und $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ wurden durch die Fraktion von IP 5,6 besser transkribiert als durch die Fraktion von IP 6,6 und mit dem Matrizen-Primer $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ wurde festgestellt, daß es gerade umgekehrt war, wenn diese Matrize auch bei beiden Fraktionen viel ineffektiver war.

Das Auftreten von zwei Reverse Transkriptase-Aktivitäten mit ungleichen Eigenschaften nach der IEF-Trennung kann verschiedene Ursachen haben: einerseits könnten es zwei unabhängige Reverse Transkriptasen sein, die schon in dem Phosphocellulose-Eluat von 0,175 M KCl mit unterschiedlicher Matrizenspezifizität, Reaktionsgeschwindigkeit und Menge vorhanden waren. Andererseits ist es denkbar, daß dieses Eluat Reverse Transkriptase-Moleküle enthielt, die während der IEF teilweise oder vollständig aufgespalten wurden und daß eines

der monomeren Spaltprodukte, oder beide eine andere Matrizenspezifizität aufweisen als das vollständige Enzym. Für die Annahme, daß die beiden Reverse Transkriptase-Aktivitäten in der Phosphocellulosefraktion (0,175 M KCl) nicht unbeteiligt nebeneinander vorlagen, spricht allerdings auch die Zunahme der Gesamtaktivität für die Transkription von $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ und $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$, die in den beiden Fraktionen (IP 6,6 und IP 5,6) zusammengenommen nach der IEF-Trennung zu beobachten war (Tab. 10 und Abb. 14a). Diese Betrachtungsweise steht auch mit der zweiten und dritten Modellüberlegung in Übereinstimmung, die zu den Resultaten der SDS-Elektrophorese angestellt wurden.
Aufgrund der bisher diskutierten Ergebnisse kann man feststellen, daß diese Reverse Transkriptase aus menschlichem Ovarialkarzinom den Reverse Transkriptasen von C-Typ Viren sehr ähnlich ist. Diese Auffassung wurde nun durch den Unterschied zu einer Reverse Transkriptase anderer Herkunft bestätigt.

Bei Mammagewebe wurden bereits positive simultane Nachweistests erhalten (MICHALIDES et al. 1975) und in grob gereinigten Extrakten Reverse Transkriptase-Aktivität mit $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ entdeckt (GERARD 1975). Außerdem wurde in einem Falle eine Reverse Transkriptase wirklich gereinigt und anschließend die Transkriptionsfähigkeit für $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ und exogene 70 S RNA geprüft (OHNO et al. 1977). Dabei zeigte sich, daß dieses Enzym bei der Matrize $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ mit Mg^{++}-Ionen eine höhere Aktivität entfaltete als mit Mn^{++}-Ionen. Außerdem wies es Antigenverwandtschaft mit der Reverse Transkriptase aus dem Primatenvirus MPV auf. Dieses gut charakterisierte Enzym stand also nicht in Beziehung zu den C-Typ Viren und es erschien deshalb sinnvoll erneut eine Reverse Transkriptase aus einem Mammakarzinom zu isolieren, um einerseits ihre Eigenschaften mit den in dieser Arbeit benutzten Methoden zu bestätigen und andererseits eine Vergleichsmöglichkeit zu der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom zu schaffen.

Das Reinigungsschema für das Enzym aus Mammakarzinom (Abb. 24) und die Elutionsprofile der Säulenchromatographien (Abb. 25-26) ähnelten weitgehend den Ergebnissen beim Ovarialkarzinom, mit dem Unterschied, daß eine höhere Gesamtaktivität und spezifische Aktivität mit $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ erzielt wurde (vergl. Tab. 11 und 17).
Die biochemische Untersuchung dieser DNA-Polymerase wurde nach den angegebenen Kriterien zur Identifizierung von Reverse Transkriptasen durchgeführt. Bei der Phosphocellulose-Chromatographie wurden zwei Enzympeaks in den Positionen von 0,185 M KCl bzw. 0,32 M KCl eluiert, die wieder für virale Enzyme bzw. DNA-Polymerase γ kennzeichnend sind (Abb. 26). Sehr ähnliche Werte für das virale Enzym fanden EBENER et al. (1979); CHANDRA und STEEL (1977); CHANDRA et al. (1978); RHO et al. (1981) sowie LOEWENSTEIN et al. (1980). Dies ist auch etwa mit dem von OHNO et al. (1977) gefundenen Ergebnis vergleichbar, die einen DNA-Polymerasepeak bei 0,18 M Phosphationen erhielten, der aber bei normalen Geweben und bei benigne erkrankten Brustdrüsen fehlte. Die spezifische Aktivität des Eluats von 0,32 M KCl war mit allen vier Matrizen recht gut (Tab. 16). Die Transkriptionsfähigkeit für $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ und das relativ hohe Verhältnis von $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ zu $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ lassen aber vermuten, daß neben der DNA-Polymerase γ auch noch Reverse Transkriptase-Aktivität in diese Fraktion hineingelangt war.

Die Natur des gereinigten Enzympeaks von 0,185 M KCl bestätigte sich durch die Transkriptionsfähigkeit für die verschiedenen Matrizen-Primer (Tab. 16). Bei $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ war sie zwar sehr gering und bei $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ lag sie noch unter dem Wert, der für die Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom gemessen wurde, aber sie erreichte mit $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ eine auffällig hohe Effektivität. Mit $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$ und mit dem Terminaltransferasetest waren, wie bei der Reverse Transkriptase aus dem Ovar, keine weiteren DNA-Polymeraseaktivitäten nachweisbar (Tab. 20).
Dieses Enzym war durch zweiwertige Kationen stimulierbar und bevorzugte im Gegenwart der Matrize $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ die

Mg^{++}-Ionen vor den Mn^{++}-Ionen (Abb. 30). Es entsprach darin also ganz den Reverse Transkriptasen der B-Typ Viren (MuMTV) und des D-Typ Virus MPV (DION und MOORE 1972; MARCUS et al. 1976; COLCHER und SCHLOM 1980; vergl. auch Tab. 1). Mit dieser Eigenschaft wird das Ergebnis von OHNO et al. (1977) bestätigt. Gleichzeitig wird ein bedeutender systematischer Unterschied zwischen der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom und dieser aus Mammakarzinom hervorgehoben.

Mit Hinsicht auf die Struktur zeigte sich eine Ähnlichkeit zwischen den beiden viralen Enzymen. Das Enzym aus Mammakarzinom konnte mit Hilfe einer IEF ebenfalls in zwei Enzymaktivitäten aufgetrennt werden, die durch IP 7,3 und IP 5,4 charakterisiert waren (Abb. 27). Sie ließen sich noch deutlicher als bei der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom aufgrund ihrer Matrizenspezifizität unterscheiden (Tab. 16): die Fraktion von IP 7,3 transkribierte $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ mit äußerst hoher spezifischer Aktivität und $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ gar nicht, während die Fraktion von IP 5,4 die erste Matrize nicht so extrem gut transkribierte, dafür aber auch Affinität zu der zweiten besaß. Die Fraktion von IP 7,3 war auch mit $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ aktiver als die Fraktion von IP 5,4.

Daß es sich trotz dieser Aufspaltbarkeit bei beiden Fraktionen noch um Reverse Transkriptase-Aktivität handelte, zeigte außer der Charakterisierung mit synthetischen Matrizen auch die Transkription der heteropolymeren Regionen von exogener 70 S RNA aus AMV (Tab. 21). Beide Enzymfraktionen von IP 7,3 und von IP 5,4 waren dazu sehr gut in der Lage. Im Vergleich zur Fraktion von IP 5,4 konnte die Fraktion von IP 7,3 die heteropolymeren Bereiche jedoch etwas besser und die Poly(A)-Sequenzen etwas weniger gut ablesen. Darin ist eine Basenspezifität erkennbar die schon mit den synthetischen Matrizen-Primern erhalten wurde.

Auch die Bevorzugung der Mg^{++}-Ionen war nach der Auftrennung durch die IEF nicht verloren gegangen (Abb. 31). Sie war

aber dann bei der Fraktion von IP 5,6 nicht mehr so deutlich ausgeprägt wie bei der Fraktion von IP 7,3. Ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden Reverse Transkriptase-Aktivitäten zeigte sich in ihrer Temperaturstabilität (Abb. 32). Bei 45 ^{o}C betrug die Halbwertszeit der einen (IP 7,3) $t_{1/2}$ = 10,5 Min. und der anderen (IP 5,4) $t_{1/2}$ = 7 Min. Ein vergleichbares Ergebnis beschreiben PANET et al. (1975). Sie isolierten zwei Reverse Transkriptase-Fraktionen aus AMV, die sich in ihrer Temperaturstabilität unterschieden und zwar handelte es sich dabei um das vollständige Enzym ($\alpha\beta$) mit $t_{1/2}$ = 15,5 Minuten und die β-Untereinheit mit 7,5 Minuten.

Zusammengefaßt kann man an diesen Ergebnissen feststellen, daß zwischen den beiden Reverse Transkriptase-Aktivitäten deutliche Unterschiede im IP und der Hitzeempfindlichkeit bestanden und daß das Enzym von IP 7,3 durch Cytidinhaltige Matrizen und Mg^{++}-Ionen noch stärker aktiviert wurde als das Enzym von IP 5,4.

Auf diese Ergebnisse sind die gleichen Überlegungen übertragbar, die schon mit Hinsicht auf die Struktur der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom angeführt werden. Obwohl der exakte Nachweis zusätzlicher Experimente bedarf, die wegen der geringen Stabilität der Enzymaktivität noch nicht angestellt werden konnten, spricht vieles dafür, daß auch diese Reverse Transkriptase auf der Ebene der Phosphocellulosechromatographie in einer Quartärstruktur, z.B. als Dimer vorlag. Unter diesem Gesichtspunkt könnte auch wieder die in diesen Falle sehr hohe Zunahme der enzymatischen Gesamtaktivität verstanden werden (Tab. 17 und 18). Man müßte annehmen, daß durch das Spalten der nativen Reverse Transkriptase im elektrischen Feld bei der IEF ein oder zwei Komponenten mit modifizierten Reverse Transkriptase - Eigenschaften erhalten wurden, weil ein hemmender oder regulierender Einfluß verloren ging, den die Untereinheiten aufeinander ausüben konnten. In diesem Sinne sind vermutlich auch die geringfügigen Verschiebungen zwischen den Maxima von

$(rA)_n \cdot (dT)_{12}$- und $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$-transkribierender Enzymaktivität zu erklären, die bei einigen Säulenchromatographien zu beobachten waren, indem man annimmt, daß während der Trennungsvorgänge in geringem Unfang ein Spaltungsprozeß der nativen Reverse Transkriptase in Untereinheiten eintrat (Abb. 25 und 26). Diese Bereiche der Eluate wurden aber immer wieder vereinigt.

Aufgrund der durchgeführten Experimente läßt sich nicht entscheiden, ob eine der beiden IEF-Fraktionen das native Enzym darstellte und die andere eine aktive Komponente davon, oder ob eine vollständige Spaltung in zwei Monomere eintrat, die beide enzymatische Aktivität besaßen.

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese wurden in beiden IEF-Fraktionen jeweils eine deutliche Peptidbande nachgewiesen (Abb. 28). Auch dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen bei der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom überein. Das Molekulargewicht der beiden Peptide wurde zu etwa 67.000 berechnet (Abb. 29). OHNO et al. (1977) erhielten mit Hilfe der Sedimentationsgeschwindigkeit 70.000 für die Reverse Transkriptase des Mammakarzinoms. Davon abweichende Resultate werden dagegen von ABRELL und GALLO (1973) und von COLCHER und SCHLOM (1980) für die Reverse Transkriptase aus einem Mammatumor des Rhesusaffen (MPV) genannt. Beide Arbeitsgruppen untersuchten das Molekulargewicht sowohl mit der SDS-Gelelektrophorese als auch mit der Sedimentationsgeschwindigkeit und die ersten Autoren fanden 110.000 und die Zweiten 80.000.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Aus menschlichem Ovarialkarzinom wurde eine Reverse Transkriptase isoliert und biochemisch und serologisch untersucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß ein C-Typ Virus an der Ausbildung des Ovarialtumors beteiligt gewesen sein könnte.

1) Die Reinheit der isolierten DNA-Polymeraseaktivität wurde durch SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen. Dabei wanderte nur eine deutliche Bande.
   Außerdem enthielt das Enzym keine Terminaltransferase-Aktivität.

2) Das Enzym wurde durch folgende Eigenschaften als Reverse Transkriptase charakterisiert:
   a) Es wurde aus der mikrosomalen Fraktion der Tumorzellen gewonnen und bei der Phosphocellulose-Chromatographie mit 0,17-0,225 M KCl eluiert.
   b) Es konnte die Matrizen-Primer $(rC)_n \cdot (dG)_{12-18}$ und $(rC_m)_n \cdot (dG)_{12-18}$ besser in DNA transkribieren als den Matrizen-Primer $(rA)_n \cdot (dT)_{12}$ und zeigte gar keine Reaktion mit $(dA)_n \cdot (dT)_{10}$.
   c) Es war in der Lage die heteropolymeren Bereiche der 70 S RNA aus AMV zu transkribieren.

3) Die Stimulierbarkeit der Enzymaktivität war mit Mn^{++}-Ionen deutlicher als mit Mg^{++}-Ionen. Dies weist darauf hin, daß die Reverse Transkriptase aus dem Ovarialtumor in Beziehung zu den C-Typ Viren steht. Diese synthetischer Zuordnung wurde besonders durch das unterschiedliche Verhalten der Reverse Transkriptase aus Mammakarzinom deutlich, die zum Vergleich mit denselben Methoden isoliert wurde. Dieses Enzym wurde viel stärker durch Mg^{++}-Ionen als durch Mn^{++}-Ionen stimuliert und dies ist als Kennzeichen der Reverse Transkriptasen aus MuMTV (B-Typ Virus) und MPV (D-Typ Virus) bekannt.
   Auch die Hemmbarkeit der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom durch Phosphationen deutet wahrscheinlich auf die Verwandtschaft zu den Reverse Transkriptasen der

C-Typ Viren hin.

4) Die Reverse Transkriptase aus Ovarialtumor zeigte eine partielle Kreuzreaktion mit neutralisierenden Antikörpern gegen die Reverse Transkriptase aus RLV. Diese serologische Beziehung ist schwer zu interpretieren, weil die Antigenverwandtschaft zwischen der Reverse Transkriptase aus RLV und den aus Tumoren isolierten Reverse Transkriptasen schon öfters beobachtet wurde, wenn gleichzeitig deutlichere Beziehungen zu Primatenviren festgestellt werden konnten.

5) Das Molekulargewicht der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom wurde mit der SDS-Gelelektrophorese bestimmt und betrug für die Phosphocellulosefraktion 70.800.

6) Die in dieser Arbeit aus Ovarialkarzinom und Mammakarzinom gereinigten Reverse Transkriptasen weisen möglicherweise strukturelle Gemeinsamkeiten auf.
   a) Die gereinigten Reverse Transkriptasen der Phosphocellulosefraktion konnten durch isoelektrische Fokusierung in zwei enzymatisch aktive Fraktionen aufgespalten werden. Damit trat in beiden Fällen eine Zunahme der enzymatischen Gesamtaktivität ein und die Spaltprodukte unterschieden sich graduell in der Matrizenspezifität.
   b) Für die Spaltprodukte wurden mit der SDS-Gelelektrophorese identische Molekulargewichte bestimmt. Sie betrugen 68.400 bei der Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom und 67.000 bei der Reverse Transkriptase aus Mammakarzinom.

7) Die gereinigten Reverse Transkriptasen besitzen eine geringe thermische Stabilität. Die Halbwertszeit der Enzymaktivität betrug für die Reverse Transkriptase aus Ovarialkarzinom (Phosphocellulosefraktion) $t_{1/2}$ = 4 Minuten bei 45 ^{o}C. Für die aus Mammakarzinom wurden bei den durch IEF getrennten Fraktionen unterschiedliche Werte von $t_{1/2}$ = 7 Minuten und $t_{1/2}$ = 10,5 Minuten gemessen.

Die Ergebnisse von Nr. 5, 6 und 7 werden so interpretiert,

daß die aus Ovarialtumor und Mammakarzinom gereinigten Reverse Transkriptasen im nativen Zustand eine Quartärstruktur besitzen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aaronson S.A., Parks W.P., Scolnick E.M. und Todaro G.J. (1971): Antibody to the RNA-dependent DNA polymerase of mammalian C-Typ RNA tumor viruses. Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 920

Abrell J.W. und Gallo R.C. (1973): Purification, characterization and comparison of the DNA polymerases from two primate RNA tumor viruses. J. Virol., 12: 431

Abrell J.W., Reitz M.S. und Gallo R.C. (1975): Transcription of 70 S RNA by DNA polymerases from mammalian RNA viruses. J. Virol., 16: 1566

Adams A., Lindhal T. und Klein G. (1973): Linear association between cellular DNA and EBV DNA in a human lymphoblastoid cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci., 70: 2888

Allaudeen H.S. und Bertino J.R. (1978): Isolation of a herpesvirus-specific DNA polymerase from tissues of an American patient with Burkitt lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 4504

Aoki T., Walling M.J., Bushar G.S., Liu M. und Hsu K.C. (1976): Natural antibodies in sera from healthy humans to antigens on surface of type C RNA viruses and cells from primates. Proc. Natl. Acad. Sci., 73: 2491

Axel R., Gulati S.C. und Spiegelman S. (1972a): Particles containing RNA-instructed DNA polymerase and virus-related RNA in human breast cancers. Proc. Natl. Acad. Sci., 69: 3133

Axel R., Schlom J. und Spiegelman S. (1972b): Presence in human breast cancer of RNA homologous to mouse mammary tumor virus RNA. Nature, 235: 32

Axel R., Schlom J. und Spiegelman S. (1972c): Evidence for translation of viral-specific RNA in cells of a mouse mammary carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci., 69: 535

Baltimore D. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. Nature, 226: 1209

Baltimore D. und Smoler D. (1971): Primer requirement and template specificity of the DNA polymerase of RNA tumor viruses. Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 1507

Baltimore D. und Smoler D. (1972): Association of an endoribonuclease with the AMV DNA polymerase. J. Biol. Chem., 247: 7282

Baxt W., Hehlmann R. und Spiegelman S. (1972): Human leukemic cells contain reverse transcriptase associated with a high molecular weight virus-related RNA. Nature New Biol., 240: 72

Beemon K., Duesberg P. und Vogt P.K. (1974): Evidence for crossing-over between AMV based on analysis of viral RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 4254

Bender W., Chien Y.H., Chattopadyay S., Vogt P.K., Gardener M.R. und Davidson N. (1978): High molecular weight RNAs of AKR, NZB und wild mouse virus and avian reticuloendotheliosis virus all have similar dimer structure. J. Virol., 25: 888

Bender W. und Davidson N. (1976): Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type-C oncornavirus RNA molecules. Cell, 7: 595

Bensadoun A. und Weinstein D. (1976): Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal. Biochem., 70: 241

Bentvelzen P. (1968): Resistance to small amounts of Bittner mammary tumor virus in offspring of C57 BL female mice with the virus. J. Natl. Cancer Inst., 41: 757

Bentvelzen P., Daams J.H., Hageman P., Calafat J. und Timmermans A. (1972): Interactions between viral and genetic factors in the origin of mammary tumors in mice. J. Natl. Cancer Inst., 48: 1089

Benveniste R.E., Lieber M.M. und Todaro G.J. (1974): A distinct class of inducible murine type C viruses which replicate in the rabbit SIRC cell line. Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 602

Benveniste R.E., Sherr C.J. und Todaro G.J. (1975): Evolution of type C viral genes: Origin of FeLV. Science, 190: 886

Benveniste R.E. und Todaro G.J. (1974): Multiple divergent copies of endogenous type C virogenes in mammalian cells. Nature, 252: 170

Benveniste R.E. und Todaro G.J. (1975): Evolution of type C viral genes. III. Preservation of ancestral murine type C viral sequences in pig cellular DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 72 4090

Ben-Zur A. und Becker Y. (1977): Requirement of host cell RNA polymerase II in the replication of HSV in α-amanitin-sensitive and-resistent cell lines. Virology, 76: 246

Bernhard W. (1960): The detection and study of tumor virus with the electron microscope. Cancer Res., 20: 712

Berns A.J., Bloemendal H, Kaufman S.J. und Verma I.M. (1973): Synthesis of DNA complementary to 14 S calf lens crystalline mRNA by reverse transcriptase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 52: 1013

Bertazzoni U, Scovazzi A.I. und Brun G.M. (1977): Chick-embryo DNA polymerase γ. Identity of γ-Polymerase purified from nuclei and mitochondria. Eur. J. Biochem., 81: 237

Billiter M.A., Parsons J.T. und Coffin J.M. (1974): The nucleotide sequence complexity of avian tumor virus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 3560

Bishop J.M. (1978): Retroviruses. Ann. Rev. Biochem., 47: 35

Bittner J.J. (1936): Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. Science, 84: 162

Bollum F.J. (1960): Calf thymus polymerase. J. Biol. Chem., 235: 2399

Bollum F.J. (1975): Mammalian DNA polymerases. In: Prog. nucleic acid res. and Mol. biol., Eds. Davidson and Cohen, Accademic Press, New York, vol. 15: 109

Bornkamm G.W., Delius H., Zimber V., Hudewentz J. und Epstein M.A. (1980): Comparison of EBV strains of different origin by analysis of the viral DNA´s. J. Virol., 35: 603

Brewer L.C. und Wells R.D. (1974): Mechanistic independence of AMV DNA polymerase and ribonuclease H. J. Virol., 14: 1494

Brugge J.S. und Erickson R.L. (1977): Identification of a transformation-specific antigen induced by an ASV. Nature, 269: 346

Burkitt D.P. (1970): General features and facial tumors. In: Burkitt's Lymphoma. Eds. Burkitt and Wright, Edinburgh, Livingstone, 6

Burton K. (1956): A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J., 62: 315

Calos M.P. und Miller J.H. (1980): Transposable elements. Cell, 20: 579

Carter R.L. (1975): Infectious mononucleosis: Model for self-limiting lymphoproliferation. Lancet, 1: 846

Chan E., Peters W.P., Sweet R.W., Ohno T., Kufe D.W., Spiegelman S., Gallo R.C. und Gallagher R.E. (1976): Characterization of a virus (HL-23) isolated from cultured acute myelogenous leukemic cells. Nature, 260: 267

Chandra P. und Appel W. (1973): Methoden der Molekularbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 52

Chandra P., Balikcioglu S. und Mildner B. (1978): Biochemical and immunological characterization of a reverse transcriptase from human melanoma tissue. Cancer Letters, 5: 299

Chandra P., Balikcioglu S. und Mildner B. (1981): Biochemical and immunological characterization of cellular DNA polymerases and a reverse transcriptase from human melanoma tissue. Cell. and Mol. Biol., 27: 239

Chandra P. und Steel L.K. (1977): Purification, biochemical caracterization and serological analysis of cellular deoxyribonucleic acid polymerases and a reverse transcriptase from spleen of a patient with myelofibrotic syndrome. Biochem. J., 167: 513

Chandra P. und Steel L.K. (1980): RNA-dependent DNA polymerase activity in ocular granulocytic sarcoma associated to acute myelomonocytic leukemia in turkish children. Biochemical and immunological characterization of the enzyme. Cancer Letters, 9: 67

Charman H.P., Kim N., White M. und Gilden R.V. (1974): Failure to detect in human sera antibodies cross-reactive with group specific antigens of MuLV. J. Natl. Cancer Inst., 52: 1409

Charman H.P., Kim N., White M., Marquardt H., Gilden R.V. und Kawakami T. (1975): Natural and experimentally induced antibodies to defined mammalian type-C virus proteins in primates. J. Natl. Cancer Inst., 55: 1419

Charman H.P., White M., Rahman R. und Gilden R.V. (1976): Species and interspecies radioimmunoassays for rat type-C virus p30: Interviral comparisons and assay of human tumor extracts. J. Virol., 17: 51

Chen J.H. und Hanafusa H. (1974): Detection of a protein of avian leukoviruses in uninfected chick cells by radioimmunoassay. J. Virol., 13: 340

Chen J.H., Lavers G.C. und Spector A. (1973): Synthesis of complementary DNA from lens mRNA with RNA-dependent DNA polymerase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 52: 767

Chopra H., Ebert P., Woodside N., Kvedar J., Albert S. und Brennan M. (1973): Electron microscopic detection of simian-type virus particles in human milk. Nature New Biol., 243: 157

Chopra H.C. und Mason M.M. (1970): A new virus in a spontaneous mammary tumor of a rhesus monkey. Cancer Res., 30: 2081

Crawford D.H., Epstein M.A., Bornkamm G.W., Achong B.C., Finerty S. und Thompson J.L. (1979): Biological and biochemical observations on isolates of EBV from the malignant epithelial cells of two nasopharyngeal carcinomas. Int. J. Cancer, 24: 294

Coffin J.M. (1979): Structure, replication and recombination of retrovirus genomes: Some unifying hypotheses. J. Gen. Virol., 42: 1

Coffin J.M. und Temin H.M. (1971): Comparison of RSV-specific deoxyribonucleic acid polymerases in virions of RSV and in RSV-infected chicken cells. J. Virol., 7: 625

Cohen J.C., Shank P.R., Morris V.L., Cardiff R. und Varmus H.E. (1979): Integration of the DNA of MuMTV in virus-infected normal and neoplastic tissue of the mouse. Cell, 16: 333

Colcher D. und Schlom J. (1980): Purification and characterization of the RNA-directed DNA polymerase of a primate type-D retrovirus: Mason-Pfizer virus. Biochem. Biophys. Acta, 607: 445

Colcher D., Spiegelman S. und Schlom J. (1974): Sequence homology between the RNA of MPV and the RNA of human malignant breast tumor. Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 4975

Cooper T.C. (1981): Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter, Berlin-New York, 49

Dahlberg J.E., Sawyer R.C., Taylor J.M., Faras A.J., Levinson W.E., Goodman H.M. und Bishop J.M. (1974): Transcription of DNA from the 70 S RNA of RSV. I. Identification of a specific 4 S RNA which serves as primer. J. Virol., 13: 1126

Darai G. und Munk K. (1973): Human embryonic lung cells abortively infected with herpesvirus hominis type-2 some properties of cell transformation. Nature, 241: 268

De Philip R.M., Lynch W.F. und Liebrman I. (1977): Nuclear DNA polymerases of human carcinomas. Cancer Res., 37: 702

De The´ G. (1979): Demographic studies implicating the virus in the causation of Burkitt´s lymphoma; prospects for nasopharyngeal carcinoma. In: The Epstein-Barr virus, Eds. Epstein and Achong, Springer Verlag, 417

De The´ G. und Geser A. (1974): Nasopharyngeal carcinoma: Recent studies and outlook for a viral etiology. Cancer Res., 34: 1196

Dhar R., Mc Clements W.L., Enquist L.W. und Vande Woude G.F. (1980): Nucleotide sequences of integrated Moloney sarcoma provirus long terminal repeats and their host and viral junctions. Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 3937

Dion A.S. und Moore D.H. (1972): Gel electrophoresis of reverse transcriptase activity of murine mammary tumor virions. Nature New Biol., 240: 17

Dion A.S., Williams C.J. und Moore D.H. (1977): RNase H and RNA-directed DNA polymerase associated enzymatic activities of MuMTV. J. Virol., 22: 187

Dmochowski L. und Grey C.E. (1957): Subcellular structure of possible viral origin in some mammalian tumors. Ann. N.Y. Acad. Sci., 68: 559

Donehower L.A., Huang A.L. und Hager G. (1981): Regulatory and coding potential of the MuMTV long terminal redundancy. J. Virol., 37: 226

Dube D.K., Kunkel T.A., Seal G. und Loeb L.A. (1979): Distinctive properties of mammalian DNA polymerases. Biochem. Biophys. Acta, 561: 369

Duesberg P.H. und Bister K. (1980): Transforming genes of retroviruses: Definition, specificity and relation to cellular DNA. In: Feline leukemia virus. Eds. Hardy, Essex und Mc Clelland, Elsevier North Holland Inc., 273

Duesberg P.H., Helm K.V. und Canaani E. (1971): Comparative properties of RNA and DNA templates for the DNA polymerase of RSV. Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 2505

Duesberg P.H. und Vogt P.K. (1979): Avian acute leukemia viruses MC 29 and MH 2 share specific RNA sequences: Evidennce for a second class of transforming genes. Proc. Natl. Acad. Sci., 76: 1633

Duff R. und Rapp F. (1971): Oncogenic transformation of hamster cells after exposure to HSV type-2. Nature, 233: 48

Ebener U., Welte K. und Chandra P. (1979): Purification and biochemical characterization of a virus-specific reverse transcriptase from human osteosarcoma tissue. Cancer Letters, 7: 179

Einhorn L. und Ernberg I. (1978): Induction of EBNA proceeds the first cellular S-Phase after EBV-infection of human lymphocytes. Int. J. Cancer, 21: 157

Eisenman R.N. und Vogt V.M. (1978): The biosynthesis of oncovirus proteins. Biochem. Biophys. Acta, 473: 187

Elgin P. (1975): Methods for isolation and characterization of nonhistone chromosomal proteins. Methods Enzymol., 40: 144

Ellerman V. und Bang O. (1908): Experimentelle Leukämie bei Hühnern. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, 46: 595

Epstein M.A. (1978): An assessment of the possible role of viruses in the etiology of Burkitt´s lymphoma. In: Prog. exp. Tumor Res., Virus and human cancer. Ed. Ito, Karger Verlag, 21: 72

Epstein M.A., Achong B.G. und Barr Y.H. (1964): Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt´s lymphoma. Lancet, 1: 702

Fan H. und Baltimore D. (1973): RNA metabolism of MuLV: Detection of virus-specific RNA sequences in infected and uninfected cells and identification of virus-specific mRNA. J. Mol. Biol., 80: 93

Farabaugh P.J. und Fink G.R. (1980): Insertion of the eukaryotic transposable element Ty1 creates a 5-base pair duplication. Nature, 286: 352

Faras A.J., Taylor J.M., Mc Donnell J.P., Levinson W.E. und Bishop J.M. (1972): Purification and characterization of the deoxyribonucleic acid polymerase associated with RSV. Biochemistry, 11: 2334

Fenner F., Mc Auslan B.R., Mims C.A., Sambrook J. und White D.O. (1974): In: The biology of animal viruses. Acad. Press, 5: 176

Fiedsteel A.H. (1974): Non-specific antiviral substances in human milk active against arbovirus and MuLV. Cancer Res., 34: 712

Fine D. und Schochetman G. (1978): Type D primate retroviruses. A review. Cancer Res., 38: 3123

Fleisher G., Henle W., Henle G., Lenneth E. und Biggar R.J. (1979): Primary infection with the EBV in infants in the U.S.A: Clinical and serological observations. J. Infect. des., 139: 553

Foster D.H. und Gurney jr. T. (1976): Nuclear location of mammalian DNA polymerase activities. J. Biol. Chem., 251: 7893

Frenkel M., Locker H., Cox B., Roizman B. und Rapp F. (1976): HSV-DNA in transformed cells: Sequence complexity in hamster cell lines and one derived hamster tumor. J. Virol., 18: 885

Frenkel M., Roizman B., Cassai E. und Nahmias A. (1972): A DNA fragment of HSV-2 and its transcription in human cervical cancer tissue. Proc. Natl. Acad. Sci., 69: 3884

Gabelman N., Waxman S., Smith W. und Douglas S.D. (1975): Apparence of type C virus-like particles after cocultivation of human tumor cell line with rat cells. Int. J. Canc., 16: 355

Gafner J. und Philippsen P. (1980): The yeast transposon Ty1 generates duplications of target DNA on insertion. Nature, 286: 414

Gallagher R.E. (1977): Molecular probes for components of type C viruses in human leukemia. In: Recent Adv. Cancer Res.: Cell biol., mol. biol and tumor virol. Ed. Gallo, CRC Press, 137

Gallagher R.E. und Gallo R.C. (1975): Type-C RNA tumor virus isolated from cultured human acute myelogenous leukemia cells. Science, 187: 350

Gallagher R.E., Salahuddin S.Z., Hall W.T., Mc Credie K.B. und Gallo R.C. (1975): Growth and differentiation in culture of leukemic leukocytes from a patient with acute myelogenous leukemia and re-identification of type-C virus. Proc. Natl. Acad. Sci., 72: 4137

Gallagher R.E., Todaro G.J., Livingston D.M. und Gallo R.C. (1974): Relationship between reverse transcriptase from human acute leukemia blood cells and primate type-C viruses. Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 1309

Gallo R.C., Gallagher R.E., Miller H., Mondal H., Saxinger W.C., Mayer R.J., Smith R.G. und Gillespie D.H. (1974): Relationship between components in primate RNA tumor viruses and in the cytoplasma of human leukemic cells: Implications to leukemogenesis. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 39: 933

Gallo R.C., Yang S.S. und Ting R.C. (1970): RNA-dependent DNA polymerase of human acute leukemic cells. Nature, 228: 927

Galloway D.A. und Mc Dougall J.K. (1981): Transformation of rodent cells by a cloned DNA fragment of HSV type 2. J. Virol., 38: 749

Gardner M.B., Rasheed S., Shimizu S., Rongey R.W., Henderson B.E. et al. (1977): Search for RNA tumor virus in humans. In: Origins of human cancer. Eds. Riatt, Watson, Winsten, CSH New York, vol B: 1235

Gerard G.F. (1975): Poly(2´-O-methylcytidylate).oligodeoxyguanylate, a template-primer specific for reverse transcriptase, is not utilized by HeLa cell γ DNA polymerases. Biochem. Biophys. Res. Commun., 63: 706

Gerard G.F. und Grandgenett D.P. (1975): Purification and characterization of the DNA polymerase and RNase H activities in Moloney murine sarcoma-leukemua virus. J. Virol., 15: 785

Gerard G.F., Loewenstein P.M., Green M. und Rottman F. (1975): Detection of reverse transcriptase in human breast tumors with poly(C_m).oligo(dG). Nature, 256: 140

Gerard G.F., Loewenstein P.M. und Green M. (1978): Detection in human ovary and prostate tumors of DNA polymerase activity that copies poly(2'-O-methylcytidylate).oligodeoxyguanylate. Cancer Res., 38: 1008

Gerard G.F., Rottman F. und Green H. (1974): Poly(2'-O-methylcytidylate).oligodeoxyguanylate as a template for RNA-directed DNA polymerase in RNA tumor viruses and as a probe for the RNA-directed enzyme in transformed murine cells. Biochemistry, 13: 1632

Gerwin B.L., Smith S.G. und Peebles P.T. (1975): Two active forms of RD-114 virus DNA polymerase in infected cells. Cell, 6: 45

Gibson W. und Verma I.M. (1974): Studies on the reverse transcriptase of RNA tumor viruses. Structural relatedness of two subunits of avian RNA tumor viruses. Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 4991

Gilboa E., Mitra S.W., Goff S. und Baltimore D. (1979): A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. Cell, 18: 93

Gillespie D., Saxinger W.C. und Gallo R.C. (1975): Information transfer in cells infected by RNA tumor viruses and extension to human neoplasia. Prog. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol., 15: 1

Glaser R., Ogino T., Zimmerman J. und Rapp F. (1973): Thymidine kinase activity in Burkitt lymphoblastoid somatic cell hybrids after induction of the EBV. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 142: 1059

Goodenow R.S. und Kaplan H.S. (1979): Characterization of the reverse transcriptase of a type C RNA virus produced by a human lymphoma cell line. Proc. Natl. Acad. Sci., 76: 4971

Goodman N.C. und Spiegelman S. (1971): Distinguishing reverse transcriptase of an RNA tumor virus from other known DNA polymerases. Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 2203

Grandgenett D.P., Gerard G.F. und Green M. (1972): Ribonuclease H: A ubiquitous activity in virions of ribonucleic acid tumor viruses. J. Virol., 10: 1136

Grandgenett D.P., Gerard G.F. und Green M. (1973): A single subunit from AMV with both RNA-directed DNA polymerase and ribonuclease H activity. Proc. Natl. Acad. Sci., 70: 230

Green M., Grandgenett D.P. und Gerard G.F. (1974): Properties of oncornavirus RNA-directed DNA polymerase, the RNA template and the intracellular products formed early during infection and cell transformation. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 39: 975

Green M., Rokutanda M., Fujinaga K, Ray R.K., Rokutanda K. und Gurgo C. (1970): Mechanism of carcinogenesis by RNA tumor viruses. An RNA-dependent DNA polymerase in MuSV. Proc. Natl. Acad. Sci., 67: 385

Guntaka R.V., Mahy B.W., Bishop J.M. und Varmus H.E. (1975): Ethidium bromide inhibits appearance of closed circular viral DNA and integration of virus specific DNA in duck cells infected with ASV. Nature, 235: 507

Hall B.D. und Spiegelman S. (1961): Sequence complementary of T2-DNA and T2-specific RNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 47: 137

Hampar B., Lenoir G., Nonoyama M., Derge J.G. und Chang S.Y. (1976): Cell cycle dependance for activation of EBV by inhibitors of protein synthesis or medium deficient in arginine. Virology, 69: 660

Hampar B., Tanaka A., Nonoyama M. und Derge J.G. (1974): Replication of the resistent repressed EBV genome during the early S phase (S-1 period) of nonproducer Raji cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 631

Hardy W.D. jr. (1980): The virology, immunology and epidemiology of the FeLV. In: Feline leukemia virus. Eds. Hardy, essex, Mc Clelland. Elsevier North Holland, vol 4: 33

Hayward S.D. (1977): Size and genetic content of viral RNA's in avian oncovirus-infected cells. J. Virol., 24: 47

Hayward S.D. und Kieff E. (1976): EBV-specific RNA. I. Analysis of viral RNA in cellular extracts and in the polyribosomal fraction of permissive and nonpermissive lymphoblastoid cell lines. J. Virol., 18: 518

Hehlman R., Kufe D. und Spiegelman S. (1972): Viral-related RNA in Hodgkin's disease and other human lymphomas. Proc. Natl. Acad. Sci., 69: 1727

Henle G. und Henle W. (1966): Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. J. Bact., 91: 1248

Henle G. und Henle W. (1968): Effect of arginine deficient media on HSV associated with cultured Burkitt tumor cells. J. Virol., 2: 182

Henle W. und Henle G. (1979): Seroepidemiology of the virus. In: The Epstein-Barr virus. Eds. Epstein, Achong. Springer Verlag, 61

Henle G., Henle W. et al. (1969): Antibodies to EBV in Burkitt's lymphoma and control groups. J. Natl. Cancer Inst., 43: 1147

Henle G., Henle W., Klein G., Gunven P., Clifford P., Morrow R.H. und Ziegler J.L. (1971): Antibodies to early EBV induced antigens in Burkitt's lymphoma. J. Natl. Cancer Inst., 48: 861

Highfield P.E., Rafield L.F., Gilmer T.A. und Parsons J.T. (1980): Molecular cloning of ASV closed circular DNA: Structural and biological characterization of three recombinant clones. J. Virol., 36: 271

Hishinuma F., De Bona P.J., Astrin S. und Skalka A.M. (1981): Nucleotide sequence of acceptor site and termini of integrated avian endogenous provirus ev1: Integration creates a 6 bp repeat of host DNA. Cell, 23: 155

Ho J.H. (1972): Nasopharyngeal carcinoma. In: Adv. Cancer Res. Eds. Klein, Weinhouse, Haddow. Accad. Press, 15: 57

Holman K.H. (1973): Human mammary tumor virus. Biomedicine, 18: 103

Hsu T.W., Sabran J.L., Mark G.E., Guntaka R.V. und Taylor J.M. (1978): Analysis of unintegrated avian RNA tumor virus double-stranded DNA intermediates. J. Virol., 28: 810

Huang F.S. (1975): Human cytomegalovirus. IV. Specific inhibition of virus induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by PAA. J. Virol., 16: 1560

Huebner R.J. und Todaro G.J. (1969): Oncogenes of RNA tumor viruses as determinant of cancer. Proc. Natl. Acad. Sci., 64: 1087

Hughes S.H., Shank P.R., Spector D.H., Kung H.J., Bishop J.M. und Varmus H.E. (1978): Proviruses of ASV are terminally redundant, co-existive with unintegrated linear DNA and integrated at many sites. Cell, 15: 1397

Jacquet M., Groner Y., Monroy G. und Hurwitz J. (1974): The in vitro synthesis of AMV RNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 8

Jamjoom G.A., Nass R.B. und Arlinghaus R.B. (1977): Further characterization of intracellular precursor polyproteins of RLV. Virology, 78: 11

Jariwalla R.J. (1981): Neoplastic transforming activity of defined HSV-2 DNA fragments representing 6,5-13% of the viral genome. In: Proc. Int. Workshop on Herpesviruses.

Jondal M. und Klein G. (1973): Surface markers on human B und T lymphocytes. II. Presence of EBV receptors on B lymphocytes. J. Exp. Med., 138: 1365

Ju G., Boone L. und Skalka A.M. (1980): Isolation and characterization of recombinant DNA clones of avian retroviruses: Size heterogenicity and instability of the directed repeat. J. Virol., 33: 1026

Ju G. und Skalka A.M. (1980): Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat (LTR) of avian retroviruses: structural similarities with transposable elements. Cell, 22: 379

Judson S.C., Henle W. und Henle G. (1977): A cluster of EBV-associated American Burkitt's lymphoma. N. Engl. J. Med., 297: 464

Kacian D.L., Spiegelman S., Bank A., Terada M., Metafora S., Dow L. und Marks P.A. (1972): In vitro synthesis of DNA components of human genes for globins. Nature New Biol., 235: 167

Kacian D.L., Watson K.F., Burney A. und Spiegelman S. (1971): Purification of the DNA polymerase of AMV. Biochem. Biophys. Acta, 246: 365

Kalter S.S., Helmke R.J., Heberling R.L., Parigel M., Fowler A.K., Strickland J. und Hellman A. (1973): C-type particles in normal human placentas. J. Natl. Cancer Inst., 50: 1081

Kaplan H.S., Goodenow R.S., Epstein A.L., Gartner S., Decleve A. und Rosenthal P.N. (1977): Isolation of a type-C RNA virus from a established human hystiocytic lymphoma cell line. Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 2564

Keighly E. (1968): Carcinoma of the cervix among prostitues in a women's prison. Br. J. Ven. Dis., 44: 254

Keller W. und Crouch R. (1972): DNA polymerases of cellular and viral origin. Proc. Natl. Acad. Sci., 69: 3360

Keller W. und Crouch R. (1973): The relationship of viral to cellular ribonuclease H. In: Possible episomes in eukaryotes. Ed. Silvestri. North Holland Publ., Amsterdam, 123

Kerr J.A., Olshevsky U., Lodisch H. und Baltimore D. (1976): Translation of MuLV RNA in cell-free systems from animal cells. J. Virol., 18: 627

Keshet E. und Temin H.M. (1978): Sites of integration of REV-DNA in chicken DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 3372

Kessler I. (1976): Human cervical cancer as a venereal disease. Cancer Res., 36: 783

Kieras R.M. und Faras A.J. (1975): DNA polymerase of REV: Inability to detect endogenous RNA-directed DNA synthesis. Virology, 65: 514

King A.M. (1976): High molecular weight RNAs from RSV and Mo-MuLV contain two subunits. J. Biol. Chem., 25: 14

Kiessling A. und Goulian M. (1976): A comparison of the enzymatic responses of the DNA polymerases from four RNA tumor viruses. Biochem. Biophys. Res. Commun., 71: 1069

Klucis E., Jackson L. und Parsons P.G. (1976): Survey of human lymphoblastoid cell lines and primary cultures of normal and leukemic leukocytes for oncornavirus production. Int. J. Cancer, 18: 413

Knopf K.W., Yamada M. und Weissbach A. (1976): HeLa cell DNA polymerase γ: Further purification and properties of the enzyme. Biochemistry, 15: 4540

Koliais S., Bjursell G., Adams A., Lindahl T. und Klein G. (1978): State of EBV DNA in an American Burkitt lymphoma line. J. Natl. Cancer Inst., 60: 991

Kopchick J.J., Jamjoom G.A., Watson K.F. und Arlinghaus R.B. (1978): Biosynthesis of RLV reverse transcriptase by synthesis and cleavage of a "gag-pol" read-through viral precursor polyprotein. Proc. Natl. Acad., Sci., 75: 2016

Kornberg A. (1974): DNA synthesis. Freeman, San Francisco, 55

Kotler M., Weinberg E., Haspel O., Olshevsky N. und Becker Y. (1973): Particles released from arginine-deprived human leukemic cells. Nature New Biol., 244: 197

Kramarsky B., Sarkar N.H. und Moore D.H. (1971): Ultrastructural comparison of a virus from a rhesus monkey mammary carcinoma with four oncogenic RNA viruses. Proc. Natl. Acad., Sci., 68: 1603

Kufe D.W., Peters W.P. und Spiegelman S. (1973): Unique nuclear DNA sequences in the involved tissue of Hodgkin's and Burkitt's lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci., 70: 3810

Kurth R., Teich N., Weiss R. und Oliver R.T. (1977): Natural human antibodies reactive with primate type-C viral antigens. Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 1237

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembley of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680

Lai M.H. und Verma I.M. (1978): Reverse transcriptase of RNA tumor viruses. V. In vitro proteolysis of reverse transcriptase from AMV and isolation of a polypeptide manifesting only RNase H activity. J. Virol., 25: 652

Laufs R. und Steinke G. (1975): No evidence for particles encapsulating RNA-instructed DNA polymerase and high molecular weight virus-related RNA in HSV induced tumors of non-human primates. J. Gen. Virol., 27: 239

Leis J.P. (1976): RNA-dependent DNA polymerase activity of RNA tumor virus. VI. Processive mode of action of AMV polymerase. J. Virol., 19: 932

Leis J.P., Berkower J. und Hurwitz J. (1973): Mechanism of action of ribonuclease H isolated from AMV and E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci., 70: 466

Leis J.P. und Hurwitz J. (1972): RNA-dependent DNA polymerase activity of RNA tumor viruses. II. Directing influence of RNA in the reaction. J. Virol., 9: 130

Lewis B.J., Abrell J.W., Smith R.G. und Gallo R.C. (1974): DNA polymerases in human lymphoblastoid cells infected with SiSV. Biochem. Biophys. Acta, 349: 148

Lieber M.M., Sherr C.J., Todaro G.J., Benveniste R.E., Callahan R. und Coon H.G. (1975): Isolation from the Asian mouse Mus caroli of an endogenous type C virus related to infectious primate type C virus. Proc. Natl. Acad. Sci., 72: 2315

Lieber M.M. und Todaro G.J. (1973): Spontaneous and induced production of endogenous type C RNA virus from a cloned line of spontaneously transformed Balb/3T3. Int. J. Cancer, 11: 616

Lindahl T., Adams A., Bjursell G., Bornkamm G.W., Kashka-Dietrich C. und John U. (1976): Covalently closed circular duplex DNA of EBV in a human lymphoid cell line. J. Mol. Biol., 102: 511

Lindahl T., Klein G., Reedman B.M., Johansson B. und Siugh S. (1974): Relationship between EBV DNA and EBV determined nuclear antigen (EBNA) in Burkitt lymphoma biopsies and other lymphoproliferative malignancies. Int. J. Cancer, 13: 764

Livingston D.M. und Todaro G.J. (1973): Endogenous type-C virus from a cat cell clone with properties distinct from previously described feline type-C virus. Virology, 53: 142

Loewenstein P.M., Lange G.W. und Gerard G.F. (1980): Distribution of DNA polymerase Cm in normal and malignant human tissues. Cancer Res., 40: 4398

Long G., Sachs R., Norvell J., Huebner V., Hatanaka M. und Gilden R.V. (1973): Specificity of antibody to the RD-114 viral polymerase. Nature New Biol., 24: 147

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J. (1951): Protein measurement with Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265

Luka J., Siegert W. und Klein G. (1977): Solubilization of the EBV-determined nuclear antigen and its characterization as a DNA-binding protein. J. Virol., 22: 1

Lyons M.J. und Moore D.H. (1965): Isolation of the MuMTV: chemical and morphological studies. J. Natl. Cancer Inst., 35: 549

Majors J.E. und Varmus H.E. (1981): Nucleotide sequences at host-proviral junctions for MuMTV. Nature, 289: 253

Mak T., Manaster J., Howatason A., Mc Culloch E. und Till J. (1974): Particles with characteristics of leukoviruses in cultures of marrow cells from leukemia patients in remission and relapse. Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 4336

Manolov G. und Manolova Y. (1972): Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphoma. Nature, 237: 33

Marcus S., Modak M.J. und Cavalieri L.F. (1974): Purification of AMV DNA polymerase by affinity chromatography on polycytidylate-agarose. J. Virol., 14: 853

Marcus S., Sarkar N.H. und Modak M.J. (1976): Purification and properties of MuMTV DNA polymerases. Virology, 71: 242

Martin G.S. und Duesberg P.H. (1972): A Subunit in the RNA of transforming avian tumor viruses. I. Occurrence in different virus strains. II. Spontaneous loss resulting in nontransforming variants. Virology, 47: 494

Martinez I. (1969): Relationship of a squamous cell carcinoma of the cervix uteri to squamous cell carcinoma of the penis among Puertorican women married to men with penil cancer. Cancer, 24: 777

Mason W.S., Friis R.R., Linial M. und Vogt P.K. (1974): Determination of the defective function in two mutants of RSV. Virology, 61: 559

Matsukage A., Bohn E.W. und Wilson S.H. (1974): Multiple forms of DNA polymerase in mouse myeloma. Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 578

Mayer R.J., Smith R.G. und Gallo R.C. (1974): Reverse transcriptase in normal rhesus monkey placenta. Science, 185: 864

Mc Cormick J.J., Larson L.J. und Rich M.A. (1974): RNase inhibition of reverse transcriptase activity in human milk. Nature, 251: 737

Mellon P. und Duesberg P.H. (1977): Subgenomic, cellular RSV RNAs contain oligonucleotides from the 3′ half and the 5′ terminus of virion. Nature, 270: 631

Melnick J.L. und Adam E. (1978): Epidemial approaches to determing wether HSV is the etiological agent of cervical cancer. In: Prog. exp. Tumor Res., Virus und human cancer. Ed. Ito, S. Karger, 21: 49

Melnick J.L., Courtney R.J., Powell K.L., Schaffer P.A. et al. (1976): Studies on HSV and cancer. Cancer Res., 36: 845

Mesa-Tejada R., Keydar I., Ramanarayanan M., Ohno T., Fenoglio O. und Spiegelman S. (1978): Detection in human breast carcinomas of an antigen immunologically related to a group-specific antigen of MuMTV. Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 1529

Michalides R., Spiegelman S. und Schlom J. (1975): Biochemical characterization of putative subviral particulates from human malignant breast tumors. Cancer Res., 35: 1003

Miller R.L., Glaser R. und Rapp F. (1977): Studies of an EBV-induced DNA polymerase. Virology, 76: 494

Modak M.J. und Marcus S.L. (1977): Purification and properties of RLV DNA polymerase and selective inhibition of mammalian viral reverse transcriptase by inorganic phosphate. J. Biol. Chem., 252: 11

Mölling K. (1974a): Reverse transcriptase and RNase H present in a murine virus and in both subunits of an avian virus. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 39: 969

Mölling K. (1974b): Characterization of reverse transcriptase and RNase H from FLV. Virology, 62: 46

Mölling K., Bolognesi D.P., Bauer H., Buesen W., Plassmann H.W. und Hausen P. (1971): Association of viral reverse transcriptase with an enzyme degrading the RNA moiety of RNA-DNA hybrids. Nature New Biol., 234: 240

Mondal H., Gallagher R.E. und Gallo R.C. (1975): RNA-directed DNA polymerase from human leukemic blood cells and from primate type-C virus-producing cells: High and low-molecular weight forms with variant biochemical and immunological properties. Proc. Natl. Acad. Sci., 72: 1194

Moore D.H. (1974): Evidence in favour of the existence of human breast cancer virus. Cancer Res., 34: 2322

Moore D.H., Sarkar N.H., Kelly C.E., Pillsbury N. und Charney J. (1969): Type B particles in human milk. Texas Rep. Biol. Med., 27: 1027

Morris V.L., Medeiros E., Ringold G.M., Bishop J.M. und Varmus H.E. (1977): Comparison of MuMTV specific DNA in inbred, wild an Asian mice and in tumors and normal organs from inbred mice. J. Mol. Biol., 114: 73

Müller M. und Grossmann H. (1972): An antigen in human breast cancer sera related to the MuMTV. Nature New Biol., 237: 116

Muñoz N. (1973): Effect of HSV type 2 and hormonal unbalance in the uterine cervix of mouse. Cancer Res., 33: 1504

Murphy E.C. jr. und Arlinghaus R.B. (1978): Cell-free synthesis of RLV "gag" and "gag-pol" precursor polyproteins from virion 35 S RNA in a mRNA-dependent translation system derived from mouse tissue culture cells. Virology, 86: 329

Murphy E.C. jr, Campos D. und Arlinghaus R.B. (1979): Cell-free synthesis of RLV "gag" and "env" gene products from separate cellular mRNA species. Virology, 93: 293

Murphy E.C. jr., Wills N. und Arlinghaus R.B. (1980): Suppresion of murine retrovirus polypeptide termination: Effect of amber suppressor tRNA on the cell-free translation of RLV, Mo-MuLV and MoMuSV 124 RNA. J. Virol., 34: 464

Murray J.A. (1911): Sci. Rep. Cancer Res. Fd., 4: 114

Nahmias A.J. und Norrild B. (1980): Oncogenic potential of HSV and their association with cervical carcinoma. In: Oncogenic Herpesviruses. Ed. Rapp, CRC Press.

Niederman J.C., Miller G., Pearson H.A. und Pagano J.S. (1976): Patterns of excretion of EBV in saliva and other oropharyngeal sites during infectious mononucleosis. N. Engl. J. Med., 294: 1355

Nonoyoma M. und Pagano J.S. (1971): Complementary RNA specific to the DNA of the EBV: Detection of EB viral genome in non productive cells. Nature New Biol., 223: 103

Nooter K., Aarssen A.M., Bentvelzen P., De Groot F.G. und van Pelt F.G. (1975): Isolation of infectious type C oncornavirus from human leukemic bone marrow cells. Nature, 256 595

Nooter K. und Bentvelzen P. (1980): Primate type-C oncoviruses. Biochem. Biophys. Acta, 605: 461

Notter M.F. und Docherty J.J. (1976): Comparative diagnostic aspects of HSV tumor associated antigens. J. Natl. Cancer Inst., 57: 483

Nowinski R.C., Edynak E. und Sarkar N.H. (1971): Serological and structural properties of MPV isolated from the mammary tumor of a rhesus monkey. Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 1608

Nyormoi O., Thorley-Lawson D.A., Elkington J. und Strominger J.L. (1976): Differencial effect of phosphonoacetic acid on the expression of EBV antigens and virus production. Proc. Natl. Acad. Sci., 73: 1745

Ohno T. und Spiegelman S. (1977): Antigenic relatness of the DNA polymerase of human breast cancer particles to the enzyme of the MPV. Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 2144

Ohno T., Sweet R.W., Hu R., Dejak D. und Spiegelman S. (1977): Purification and characterization of the DNA polymerase of human breast cancer particles. Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 764

Opperman H., Bishop J.M., Varmus H.E. und Levintow L. (1977): A joint product of the gene "gag" and "pol" of ASV: A possible precursor of reverse transcriptase. Cell, 12: 993

Pagano J.S. (1977): Molecular biological studies implicating the EBV in the etiology of Burkitt's lymphoma and certain other cancers. In: Recent Adv. Cancer Res.: Cell biol., mol. biol. and tumor virol.. Ed. Gallo, CRC Press, II: 199

Panem S., Prochownik E.V., Reale F.R. und Kirsten W.H. (1975): Isolation of type C virions from a normal human fibroblast strain. Science, 189: 297

Panet A., Verma I.M. und Baltimore D. (1975): Role of subunits of the avian RNA tumor virus reverse transcriptase. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 39: 919

Parks W.P., Scolnick E.M., Ross J., Todaro G.J. und Aaronson S.A. (1972): Immunological relationship of reverse transcriptases from ribonucleic acid tumor viruses. J. Virol., 9: 110

Paterson B.M., Marciani D.J. und Papas T.S. (1972): Cell-free synthesis of the precursor polypeptide for avian myeloblastosis viral DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 4951

Pattengale P.K., Smith R.W. und Perlin E. (1974): Atypical lymphocytes in acute IM. Identification by multiple T und B lymphocyte markers. N. Engl. J. Med., 291: 1145

Peebles P.T., Scolnick E.M. und Howk R.S. (1976): Increased sarcoma virus RNA in cells transformed by leukemia virus: Model for leukemogenesis. Science, 192: 1143

Pereya A.J. (1961): The relationship of sexual activity to cervical cancer. Cancer of the cervix in a prison population. Obstet. Gynecol., 17: 154

Peters G. und Glover C. (1980): tRNA´s and priming of RNA-directed DNA synthesis in MuMTV. J. Virol., 35: 31

Philipson L., Andersson P., Olshevsky U., Weinberg R., Baltimore D. und Gesteland R. (1978): Translation of MuLV and MSV RNAs in nuclease-treated reticulocyte extracts: Enhancement of the "gag-pol" polypeptide with yeast suppressor tRNA. Cell, 13: 189

Pizzo P.A., Chattopadhyay S.K., Magrath I.T., Del Giacco E., Sherrick D. und Gray T. (1981): Examination of EBV and type C proviral sequences in American and African lymphomas and derivative cell lines. Cancer Res., 41: 3165

Poiesz B.J., Ruscetti F.W., Gazdar A.F., Bunn P.A., Minna J.D. und Gallo R.C. (1980): Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 7415

Powell K.L. und Purifoy D.J. (1977): Non structural proteins of HSV. I. Purification of the induced DNA polymerase. J. Virol., 24: 618

Priori E.S., Dmochowski L. Mayers B. und Wilbur J.R. (1971): Constant production of type C particles in a contineous tissue culture derived from pleural effusion cells of a lymphoma patient. Nature New Biol., 232: 61

Purchio A.F., Erickson E., Brugge J.S. und Erickson R.L. (1978): Identification of a polypeptide encoded by the ASV "src" gene. Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 1567

Purtilo D.T., Sakamoto K., Saemmolsen A.K. et al. (1981): Documentation of EBV infection in immunodeficient patients with life-threatening lymphoproliferative diseases by clinical, virological and immunopathological studies. Cancer Res., 41: 4226

Rapp F. und Reed C.L. (1977): The viral etiology of cancer. Cancer, 40: 419

Rapp F. und Westmoreland D. (1976): Cell transformation by DNA-containing viruses. Biochem. Biophys. Acta, 458: 167

Rapp U.R., Nowinski R.C., Reznikoff C.A. und Heidelberger C. (1975): Endogenous oncornaviruses in chemically transformation. I. Transformation independent of virus production. Virology, 65: 392

Reddy E.P., Smith M.J., Canaani E., Robbins C., Tronick S.R., Zain S. und Aaronson S.A. (1980): Nucleotide sequence analysis of the transforming region and large terminal redundancies of Mo-MuSV. Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 5234

Reedman A.M. und Klein G. (1973): Cellular localisation of an EBV-associated complement fixing antigen in producer and nonproducer lymphoblastoid cell lines. Int. J. Cancer, 11: 499

Rho H.M. und Gallo R.C. (1980): Biochemical and immunological properties of the DNA polymerase and RNase H activities of purified FeLV reverse transcriptase. Cancer Letters, 10: 207

Rho H.M., Poiesz B.J., Ruscetti F.W. und Gallo R.C. (1981): Characterization of the reverse transcriptase from a new retrovirus (HTLV) produced by a human cutaneous T-cell lymphoma cell line. Virology, 112: 355

Rickinson A.B., Finerty S. und Epstein M.A. (1977): Comparative studies on adult donor lymphocytes infected by EBV in vivo or in vitro: Origin of transformed cells arising in co-cultures with fetal lymphocytes. Int. J. Cancer, 19: 775

Ringold G.M., Shank P.R., Varmus H.E., Ring J. und Yamamoto K.R. (1979): Integration and transcription of MuMTV DNA in rat hepatoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 76: 665

Robert M.S., Smith R.G., Gallo R.C., Sarin P.S. und Abrell J.W. (1972): Viral and cellular DNA polymerases: Comparison of activities with synthetic and natural RNA templates. Science, 176: 798

Robert-Guroff M., Schrecker A.W., Brinkman B.J. und Gallo R.C. (1977): DNA polymerase γ of human lymphoblasts. Biochemistry, 16: 2866

Rocchi G., de Felici A., Ragona G. und Heinz A. (1977): Quantitative evolution of EBV-infected mononuclear peripheral blood leukocytes in IM. N. Engl. J. Med., 269: 132

Ross J., Aviv H., Scolnick E. und Leder P. (1972): In vitro synthesis of DNA complementary to purified rabbit globin mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 69: 264

Rous P. (1911): Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. J. Amer. Med. Assoc., 56: 198

Roy-Burman P., Rangey R.W., Henderson B.E. et al. (1973): Attemps to detect RNA tumor virus in human milk. Nature New Biol., 224: 146

Rymo L., Parsons J.T., Coffin J.M. und Weissman C. (1974): In vitro synthesis of RSV-specific RNA is catalyzed by a DNA-dependent RNA polymerase (actimomycin D/α amanitin/assay of virus-specific RNA). Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 2782

Sabran J.L., Hsu T.W., Yeater C., Kaji A., Mason W.S. und Taylor J.M. (1979): Analysis of integrated avian RNA tumor virus DNA in transformed chicken, duck and quail fibroblasts. J. Virol., 29: 170

Sarin P.S., Friedman B. und Gallo R.C. (1977): Purification and characterization of BaEV DNA polymerase. Biochem. Biophys. Acta, 479: 198

Sarin P.S. und Gallo R.C. (1975): Characterization of terminal deoxynucleotidyltransferase in a cell line (8402) derived from a patient with ALL. Biochem. Biophys. Res. Commun., 65: 673

Sarin P.S. und Gallo R.C. (1976): Purification and characterization of GaLV DNA polymerase. Biochem Biophys. Acta, 454: 212

Sarkar N.H. (1980): Type B virus and human breast cancer. In: The role of viruses in human cancer. Eds. Girardo, Beth. Elsevier North Holland, 1: 207

Sarkar N.H. und Moore D.H. (1972): On the possibility of a human breast cancer virus. Nature, 236: 103

Sarkar N.H., Moore D.H. und Charney J. (1973): The effect of pH on the morphology, electrophoretic mobility and infectivity of the MuMTV. Cancer Res., 33: 2283

Sarngadharan M.G., Robert-Guroff M. und Gallo R.C. (1978): DNA polymerases of normal and neoplastic mammalian cells. Biochem. Biophys. Acta, 516: 419

Sarngadharan M.G., Sarin P.S., Reiz M.S. und Gallo R.C. (1972): Reverse transcriptase activity of human acute leukemic cells: Purification of the enzyme, response to AMV 70 S RNA and characterization of the DNA product. Nature New Biol., 240: 67

Sawada H., Tashima N., Nakamura T., Uchiyama T. et al. (1977): RNA-Reverse transcriptase complex from cultured human myeloma leukemic cells. Int. J. Cancer, 20: 15

Schlabach A., Fridlender B., Bolden A. und Weissbach A. (1971): DNA-dependent DNA polymerase from HeLa cell nuclei. II. Template and substrate utilization. Biochem. Biophys. Res. Commun., 44: 879

Schlom J., Michalides R., Kufe D., Hehlamn K., Spiegelman S., Bentvelzen P. und Hageman P. (1973): A comparative study of the biologic and molecular basis of murine mammary carcinoma: A model for human breast cancer. J. Natl. Cancer Inst., 51: 541

Schlom J., Schochetman G., Michalides R., Kimball P., Drohan W. und Colcher D. (1977): Characterization of the RNA genoms and proteins of the MuMTV, the MPV and the BUdT-induced Guinea pig virus. In: Recent Adv. Cancer Res.: Cell biol., mol. biol. and tumor virol.. Ed. Gallo, CRC, III: 89

Schlom J. und Spiegelman S. (1971): Simultaneous detection of reverse transcriptase and high molecular weight RNA unique to oncogenic RNA viruses. Science, 174: 840

Schlom J., Spiegelman S. und Moore D. (1972): Detection of high molecular weight RNA in particles from human milk. Science, 175: 542

Scolnick E.M., Aaronson S.A., Todaro G.J. und Parks W.P. (1971): RNA-dependent DNA polymerase activity in mammalian cells. Nature, 229: 318

Scolnick E.M., Parks W.P., Todaro G.J. und Aaronson S.A. (1972): Immunological characterization of primate type C virus reverse transcriptase. Nature New Biol., 235: 35

Scolnick E.M., Rands E., Williams D. und Parks W. (1973): Studies on the nucleic acid sequences of Kirsten sarcoma virus: A model for formation of a mammalian RNA-containig sarcoma virus. J. Virol., 12: 458

Seman G. und Seman C. (1968): Electron microscopic search for virus particles in patients with leukemia and lymphoma. Cancer, 22: 1033

Shank P.R., Hughes S.H., Kung H.J., Majors J.E., Quintrell N., Guntaka R.V., Bishop J.M. und Varmus H.E. (1978): Mapping unintegrated ASV DNA: Termini of linear DNA bear 300 nucleotides present once or twice in two species of circular DNA. Cell, 15: 383

Shank P.R. und Varmus H.E. (1978): Virus-specific DNA in the cytoplasm of ASV-infected cells is a precursor to covalently closed circular viral DNA in the nucleus. J. Virol., 25: 104

Shapiro A.L., Viñuela R. und Maizel J.V. jr. (1967): Molecular weight estimation of poplypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Commun., 28: 815

Sherr C.J., Lieber M.M., Benveniste R.E. und Todaro G.J. (1974): Endogeneous BV-M7: Biochemical and immunological characterization. Virology, 58: 492

Sherr C.J. und Todaro G.J. (1974): Type C viral antigens in man. I. Antigens related to endogeneous primate virus in human tumors. Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 4703

Sherr C.J. und Todaro G.J. (1975): Primate type C virus p30 antigens in cells from humans with acute leukemia. Science, 187: 855

Shimotohno K., Mizutani S. und Temin H.M. (1980): Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements. Nature, 285: 550

Shoemaker C., Goff S., Gilboa E., Paskind M., Mitra S.W. und Baltimore D. (1980): Structure of a cloned circular Mo-MuLV DNA molecule containing an inverte segment: Implications for retrovirus integration. Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 3932

Shope T., Dechairo D. und Miller G. (1973): Malignant lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with EBV. Proc. Natl. Acad. Sci., 70: 2487

Shurin S. (1979): Infectious mononucleosis. Ped. Clinics North Am., 26: 315

Singer A., Reid B. und Coppleson M. (1975): The role of a high-risk male in the etiology of cervical carcinoms. A correlation of epidemiology and molecular biology. Amer. J. Obstr. Gynecol., 126: 110

Snyder H.W. jr., Pincus T. und Fleissner E. (1976): Specificities of human immunoglobulins reactive with antigens in preparations of several mammalian type C viruses. Virology, 75: 60

Spadari S. und Weissbach A. (1974): The interrelation between DNA synthesis and various DNA polymerases activities in synchronized HeLa cells. J. Mol. Biol., 86: 11

Spiegelman S., Burny A., Das M.R., Keydar J., Schlom J., Travnicek M. und Watson K. (1970): Synthetic DNA-RNA hybrids and RNA-RNA duplexes as templates for the polymerases of the oncogenic RNA viruses. Nature, 228: 430

Spiegelman S., Fuge D., Hehlmann R. und Peters W.P. (1973): Evidence for RNA tumor viruses in human lymphoma including Burkitt's disease. Cancer Res., 33: 1515

Spiegelman S., Watson K. und Kacian D. (1971): Synthesis of DNA complements of natural RNAs: A general approach. Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 2843

Stacey D.W., Allfrey V.G. und Hanafusa H. (1977): Microinjection analysis of envelope-glycoprotein activities of avian leukosis viral RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 1614

Stacey D.W. und Hanafusa H. (1978): Nuclear conversion of avian leukosis virion RNA into an envelope-glycoprotein messenger. Nature, 273: 779

Stavrianopoulos J.G., Karkas J.D. und Chargoff E. (1971): Nucleic acid polymerase of the developing chicken embryo: A DNA polymerase preferring an hybrid template. Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 2207

Steffen D. und Weinberg R.A. (1978): The integrated genom of MuLV. Cell, 15: 1003

Stephenson J.R. und Aaronson S.A. (1976): Type C RNA viruses and oncogenesis: Lack of evidence for the association of type C viruses of the woolly monkey and gibbon apes with human neoplasia. Proc. Natl. Acad. Sci., 73: 1725

Stephenson J.R., Khan A.S., Van de Van W.J., Reynolds F.H. jr. (1979): Type C retroviruses as vector for cloning cellular genes with probable transforming function. J. Natl. Cancer Inst., 63: 1111

Strand M. und August J.T. (1974): Type C RNA virus gene expression in human tissues. J. Virol., 14: 1584

Summers W.C. und Klein G. (1976): Inhibition of EBV DNA synthesis and late gene expression by phosphonoacetic acid. J. Virol., 18: 151

Sutcliffe J.G., Shinnick T.M., Verma I.M. und Lerner R.A. (1980): Nucleotide sequence of Mo-MuLV: 3′ end reveals details of replication, analogy to bacterial transposons and an unexpected gene. Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 3302

Swanstrom R., De Lorbe W.J., Bishop J.M. und Varmus H.E, (1981): Nucleotide sequence of cloned unintegrated ASV DNA: Viral DNA contains direct and inverted repeats similar to those in transposable elements. Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 124

Taylor J.M. (1977): An analysis of the role of tRNA species as primers for the transcription into DNA of RNA tumor virus genome. Biochem. Biophys. Acta, 473: 57

Teich N.M., Weiss R.A., Salahuddin S.Z., Gallagher R.E., Gillespie D.H. und Gallo R.C. (1975): Infective transmission and characterization of C-type virus released by cultured human myeloid leukemia cells. Nature, 256: 551

Temin H. (1964): Nature of the provirus of Rous sarcoma. Nat. Cancer Inst. Monogr., 17: 557

Temin H. (1981): Structure, variation and synthesis of retrovirus long terminal repeat. Cell, 27: 1

Temin H.M. und Baltimore D. (1972): RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. Adv. Virus Res., 17: 129

Temin H.M. und Mizutani S. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of RSV. Nature, 226: 1211

Thomssen R., Nobach E. und Cano y Diaz K. (1973): Untersuchungen über die Häufigkeit B-Partikel-ähnlicher Strukturen in benigne und maligne verändertem menschlichen Mammagewebe. Deut. Med. Wochenschr., 98: 162

Todaro G.J. (1972): "Spontaneous" release of type C viruses from clonal lines of "spontaneously" transformed Balb/3T3 cells. Nature New Biol., 240: 157

Todaro G.J. (1976): Type C virogenes: Model of transmission and evolutionary aspects. In: Modern Trends in human Leukemia. Eds. Neth, Gallo, Mannweiler, Moloney. Lehmanns Verl. München, 357

Todaro G.J. und Gallo R.C. (1973): Immunological relationship of DNA polymerase from human acute leukemia cells and primate and mouse leukemia virus reverse transcriptase. Nature, 244: 206

Tronick S., Stephenson J. Verma T. und Aaronson S. (1975): Thermolabile reverse transcriptase of a mammalian leukemia virus mutant temperature sensitive in its replication and sarcoma helper functions. J. Virol., 16: 1476

Vaidya A.B., Black M.M., Dion A.S. und Moore D.H. (1974): Homology between human breast tumor RNA and MuMTV genome. Nature, 249: 565

Van Beveren C., Goddard J.G., Berns A. und Verma I.M. (1980): Structure of Moloney murine leukemia viral DNA: Nucleotide sequence of the 5´ long terminal repeat and adjacent cellular sequences. Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 3307

Van Beveren C., van Straaten F., Gallenshaw J.A. und Verma I.M. (1981): Nucleotide sequence of the genome of a MuSV. Cell, 27: 97

Van Muijen G.N. und Warnaar S.O. (1980): Isolation and partial characterization of the reverse transcriptases of RLV, SiSV and RD 114 virus. Biochem. Biophys. Acta, 609: 483

Van Zaane D., Gielkens A.L., Hesselin K.W. und Bloemers H.P. (1977): Identification of RLV-specific mRNA's for the synthesis of "gag" and "env"-gene products. Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 1855

Varmus H.E. (1982): Form and function of retroviral proviruses. Science, 216: 812

Verma I.M. (1975): Studies on reverse transcriptase of RNA tumor viruses. III. Properties of purified Mo-MuLV DNA polymerase and associated RNase H. J. Virol., 15: 843

Verma I.M. (1977): The reverse transcriptase. Biochem. Biophys. Acta, 473: 1

Verma I.M., Mason W.S., Drost S.D. und Baltimore D. (1974a): DNA polymerase activity from two temperature-sensitive mutants of RSV is thermolabile. Nature, 251: 27

Verma I.M., Meuth N.L., Fan H. und Baltimore D. (1974b): HaLV: Lack of endogenous DNA synthesis and unique structure of its DNA polymerase. J. Virol., 13: 1075

Verma I.M., Temple G., Fan H. und Baltimore D. (1972): In vitro synthesis of DNA complementary to rabbit reticulocyte 10 S RNA. Nature New Biol., 235: 163

Vogel A. und Chandra P. (1981): Evidence for two forms of reverse transcriptase in human placenta of a patient with breast cancer. Biochem. J., 197: 553

Vosika G.J., Kirvit W., Gerard J.M., Coccia P.F., Nesbit M.E., Coalson J.J. und Kennedy B.J. (1975): Oncornavirus-like particles from cultured bone marrow cell preceding leukemia and malignant histiocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci., 72: 2804

Walters L.C., Mullin B.C., Ho T. und Yang W.K. (1975): Ability of tryptophan tRNA to hybridize with 35 S RNA of AMV and to prime reverse transcriptase in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci., 72: 2155

Wang L.M. (1978): The gene order of the avian tumor viruses derived from biochemical analysises of deletion mutants and viral recombinants. Ann. Rev. Microbiol., 32: 561

Wang L.M. und Duesberg P.H. (1973): DNA polymerase of murine sarcoma-leukemia virus: Lack of detectable RNase H and low activity with viral RNA and natural DNA templates. J. Virol., 12: 1512

Watson K.F., Mölling K. und Bauer H. (1973): Ribonuclease H activity present in purified DNA polymerase from AMV. Biochem. Biophys. Res. Commun., 51: 232

Weber K. und Osborn M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244: 4406

Weiman B.J., Klug N., Dube S.K., Ehrenstein G., Krieg J.C., Kind J. und Ostertag W. (1975): Particles-associated RNA-dependent DNA polymerase and high molecular weight RNA in a human cell line derived from polycythemia vera bone marrow. J. Natl. Cancer Inst., 55: 537

Weiman J., Schmidt J. und Wolfrum D. (1974): RNA-dependent DNA polymerase and ribonuclease H from Friend virions. FEBS-Letters, 43: 37

Weinberg R.A. (1977): Structure of the intermediates leading to the integrated provirus. Biochem. Biophys. Acta, 473: 39

Weiss S.R., Hackett P.B., Oppermann H., Ulricht A., Levintow L. und Bishop J.M. (1978): Cell-free translation of ASV RNA: Suppression of the "gag" termination codon does not augment synthesis of the joint "gag-pol" product. Cell, 15: 607

Weiss R.A., Mason W.S. und Vogt P.K. (1973): Genetic recombinants and heterozygotes derived from endogenous and exogenous avian RNA tumor viruses. Virology, 52: 535

Wells R., Flügel R., Larson J., Schendel P. und Sweet R. (1972): Comparison of some reactions catalyzed by deoxyribonucleic acid polymerase from AMV. E. coli and micrococcus luteus. Biochem., 11: 621

Welte K., Ebener U. und Chandra P. (1979): Serological characterization of a purified reverse transcriptase from osteosarcoma of a child. Cancer Letters, 7: 189

Wentz W.B., Facog J.W., Reagan J.W. und Heggie A.D. (1975): Cervical carcinogenesis with HSV type-2. Amer. J. Obstet. Gynec., 46: 117

Witkin S.S., Egeli R.A., Sarkar N.H., Good R.A. und Day N.K. (1979): Virolysis of Mu-MTV by sera from breast cancer patients. Proc. Natl. Acad. Sci., 76: 2984

Witkin S., Ohno T. und Spiegelman S. (1975): Purification of RNA-instructed DNA polymerase from human leukemic spleens. Proc. Natl. Acad. Sci., 72: 4133

Wolf H., zur Hausen H. und Becker V. (1973): EB viral genoms in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. Nature New Biol., 244: 245

Wu A.M. und Cetta A. (1975): On the stimulation of viral DNA polymerase activity by nonionic detergent. Biochemistry, 14: 789

Wu A.M. und Gallo R.C. (1975): Reverse Transcriptase. CRC, Crit. Rev. Biochem., 3: 289

Wu A.M., Reitz M.S., Paran M. und Gallo R.C. (1974b): Mechanism of stimulation of murine type C RNA tumor virus production by glucocorticoids: Posttranscriptional effect. J. Virol., 14: 802

Wu A.M., Sarngadharan M.G. und Gallo R.C. (1974a): Separation of ribonuclease H and RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase) of murine type C RNA tumor viruses. Proc. Natl. Acad. Sci., 71: 1871

Zech L., Haglund U., Nilsson K. und Klein G. (1976): Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphoma. Int. J. Cancer, 17: 47

Ziegler J.L., Andersson M., Klein G. und Henle W. (1976): Detection of EBV DNA in American Burkitt's lymphoma. Int. J. Cancer, 17: 701

zur Hausen H. (1976): Biochemical approaches to detection of EBV in human tumors. Cancer Res., 36: 678

zur Hausen H. und Schulte-Holthausen H. (1970a): Presence of EBV nuclear acid homology in a virus-free line of Burkitt tumor cells. Nature, 227: 245

zur Hausen H., Schulte-Holthausen H., Klein G., Henle W., Henle G., Clifford P. und Santesson L. (1970b): EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature, 228: 1056

Yamamoto T., Jay G. und Pastan I. (1980): Unusual features in the nucleotide sequence of a cDNA clone derived from the common region of ASV mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 176

Yocum R.R. und Strominger J.L. (1975): RNA polymerases in human lymphoblastoid cells that contain EBV. In: Oncogenesis and Herpesvirus II. Eds. de The´, Epstein, zur Hausen. IARC Lyon, 75

Yoshimura F.K. und Weinberg R.A. (1979): Restriction endonuclease cleavage of linear and closed circular murine leukemia viral DNAs: Discovery of a smaller circular form. Cell, 16: 323

Mein akademischen Lehrer

Prof. Dr. SPOGLIANTI
Prof. Dr. BAIRATI
Prof. Dr. RANZI
Prof. Dr. PALMA
Prof. Dr. CELENTANO
Prof. Dr. BARIGOZZI
Prof. Dr. RUSSO
Prof. Dr. BELTRAMINI
Prof. Dr. CLERICI
Prof. Dr. DETTORI
Prof. Dr. LEONE
Prof. Dr. L'HANOSET
Prof. Dr. FERRONI
Prof. Dr. TONZIG
Prof. Dr. RHAESE
Prof. Dr. FASOLD
Prof. Dr. CHANDRA
Prof. Dr. KAHL
Prof. Dr. KNOTE

L E B E N S L A U F

1. Semptember 1950 wurde ich, Marilena REZZONICO in Como, Italien, als Tochter des Angestellten Giuseppe Rezzonico und seiner Ehefrau Maria Macheo geboren.

Ab 1956 besuchte ich die Grundschule in San Fermo della Battaglia, Como.

Ab 1961 die Mittelstufe der Schule "Cesare Cantù" in Como.

Ab 1964 die Oberstufe des Istituto Tecnico Commerciale "Cajo Plinio Secondo", Como.

Ab 1970 die Università degli Studi di Milano, biologische Fakultät.

17. Februar 1975 Abschluß des Studiums mit der italienischen Promotion.

Bis Ende 1978 Gymnasiallehrerin in Como.

25.5.1980 Diplom im Fachbereich Biologie der Johann-Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

1980-1982 Promotionsstudium und experimentelle Arbeit am Gustav-Embden-Zentrum der Biologischen Chemie (Universität Frankfurt am Main).

Marilena Rezzonico